

IMPERIAL AGRICULTURAL
RESEARCH INSTITUTE, NEW DELHI.

Zentralblatt
für
Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Begründet von Oskar Uhlworm

Zweite Abteilung:

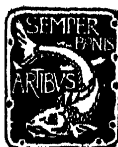
Allgemeine, landwirtschaftliche, technische, Nahrungsmittel-Bakteriologie und Mykologie (einschließlich der Gärungsphysiologie und Enzymologie), Protozoologie, Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, sowie Tierkrankheiten (ausschließlich der in das Gebiet der Medizin gehörenden)

herausgegeben von

Oberregierungsrat Dr. C. Stapp
Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 17/19

95. Band

Mit 62 Abbildungen im Text und 2 Tafeln



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1936/37

Alle Rechte vorbehalten
Printed in Germany

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 95. No. 1|4
Ausgegeben am 1. Oktober 1936.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der symbiontischen Beziehungen zwischen zellulosezersetzenden und stickstoffbindenden Bakterien.

[Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster i. W.]

Von Wilhelm Bucksteeg.

Einleitung.

Den Beziehungen zwischen Zelluloseabbau und Stickstoffbindung im Erdboden hat sich wegen ihrer hervorragenden landwirtschaftlichen und bodenbiologischen Bedeutung schon seit langer Zeit das Interesse der Forschung zugewandt. Nach zahlreichen Angaben sollen beide Vorgänge sich gegenseitig zu fördern vermögen.

Pringsheim (1909, 1910) konnte den experimentellen Beweis erbringen, daß Stickstoffbindung auf Kosten der Zelluloseabbauprodukte stattfindet, wenn er Kulturen von zelluloselösenden Bakterien und stickstoffbindenden Bakterien zusammenbrachte; er verwendete zu seinen Versuchen das stickstoffbindende „Clostridium Americanum" (Pringsheim 1906) in Reinkultur und gereinigte Kulturen anaerober, zellulosezersetzender Bakterien, die er sich im Anreicherungsverfahren nach Omelianski (1902) beschafft hatte. Ebenso konnte Alfr. Koch (1910, 1911) durch Zusatz von Zellulose in Form von Filtrierpapier zu seinen Bodenproben nach Impfung mit zellulosezersetzenden Bakterien, die er nach der Methode von van Iterson (1904) angereichert hatte, Stickstoffgewinne feststellen. Die sowohl von Pringsheim als auch von Koch ausgesprochene Vermutung, daß die Zellulosebakterien sich mit Hilfe des von den Stickstoffbindern gebundenen Stickstoffs entwickeln und Abbau der Zellulose hervorrufen, und daß weiterhin die Spaltungsprodukte der Zellulose den stickstoffbindenden Bakterien als Energiequelle für die weitere Bindung von atmosphärischem Stickstoff dienen, wurde von Pringsheim auch in späteren Versuchen (1912) wahrscheinlich gemacht. Schon Koch aber erhielt bei seinen Untersuchungen mangelhafte Übereinstimmung seiner Versuchsergebnisse. Er schreibt:

„Die Gründe aufzuklären, warum zelluloselösende Bakterien aus verschiedenen Quellen bald die Zellulose oder deren Abbauprodukte stickstoffbindenden Bakterien zugänglich machen, bald nicht, wird eine dankbare Aufgabe unserer weiteren Forschung sein." (1910, S. 6.) Pringsheim (1909) weist dann darauf hin, „daß die Verwendung von Reinkulturgemischen einen tieferen Einblick in die komplizierten Verhältnisse der Bodenzersetzung" gestattet, als ein „unkontrollierbares Bodenbakteriengemisch".

Bei den nunmehr zu nennenden Untersuchungen auf diesem Gebiete wurden als Stickstoffbinder Azotobacter chroococcum, als zellulosezersetzende Bakterien aber jene von amerikanischen Forschern als aerobe Zellulosezersetzer beschriebenen, zum großen Teil recht problematischen Formen verwendet, welche von Bergey (1923) in die physiologische Gattung Cellulomonas zusammengefaßt worden sind. ("Small rods with rounded ends, non-spore-forming, motile or non motile, occurring in soil and having the property of digesting cellulose".) — Mc. Beth (1913) konnte bei seinen Versuchen, bei denen er Azotobakter mit Bact. fimum (Mc. Beth, 1912), Bact. flavigenum (Kellermann and Mc. Beth, 1912) und Bac. rossicus (Kellermann and Mc. Beth, 1912) zusammenbrachte, Stickstoffbindung in Lösungen nachweisen, welche Zellulose als einzige Kohlenstoffquelle enthielten. Die Ergebnisse dieses Forschers verlieren jedoch durch die Feststellungen von Pringsheim und Lichtenstein (1924) an Beweiskraft,

da die von Mc. Beth benutzten Bakterien trotz ausgedehnter Versuche auf Zellulose nicht zum Wachstum zu bringen waren, oder gar Zellulose abzubauen vermochten. Der Befund von Sanborn und Hamilton (1929), daß „Cellulomonas subcreta“ und „Cellulomonas folia“ zwar nicht allein, wohl aber in Gegenwart von Azotobacter chroococcum bereits nach 2 Tagen Zellulose abbauen, muß ebenfalls als unsicher gelten.

Mit der Arbeit von Hutchinson und Clayton (1919), in welcher Spirochaeta cytophaga beschrieben wird, und an welche sich später die Untersuchungen von v. Gescher (1920), Bojanovsky (1925), Winogradsky (1929, 1932), Bokor (1930), Krzemieniewska (1930, 1933), Issatschenko und Wackenhut (1932), Rippel und Flehmig (1933) und Stapp und Bortels (1934) anschlossen, hatte inzwischen ein neuer Abschnitt der Erforschung zelluloseabbauender Bakterien eingesetzt. Hutchinson und Clayton hatten schon ihrerseits die Frage nach der Verwertbarkeit der Zellulose als Energiequelle für Azotobakter in Gegenwart von Sp. cytophaga behandelt; sie haben jedoch die entscheidenden Versuche nicht mit Reinkulturen angestellt. Makrinoff (1933) konnte durch Bakterien der Gattung Cytophaga (Winogradsky) (= Spirochaeta cytophaga) und durch die von Winogradsky (1929) neu aufgestellte Gattung Cellvibrio in Gegenwart von Azotobakter lebhafte Zellulosezersetzung bei gleichzeitiger starker Vermehrung dieser beiden Bakteriengruppen feststellen, woraus Makrinoff auf symbiontische Beziehungen zwischen ihnen schloß. Tuorila (1928) untersuchte ebenfalls die Verwendbarkeit der Zellulose als Energiequelle für stickstoffbindende Bakterien; er konnte feststellen, daß die Zellulose in Reinkulturen von Azotobakter nicht als Nährstoff verwendet werden kann, daß dagegen in Gegenwart von Zellulosezersetzern und Bodensuspensionen, die „viele kleine Kokken und Stäbchen“ enthielten, der Zellstoff bzw. seine Abbauprodukte als Energiequelle für Azotobakter dienen können.

Nach den hier mitgeteilten Angaben unterliegt es zwar keinem Zweifel, daß in der Natur Zellulose die Kohlenstoffquelle für die Stickstoffbinder darstellen kann. Jedoch sind die Einzelheiten der mikrobiologischen Zusammenhänge zwischen Zelluloseabbau und Stickstoffbindung unbekannt, da die meisten der angeführten Untersuchungen nicht mit Reinkulturen bestimmter Zellulosezersetzer und Stickstoffbinder durchgeführt worden sind. Es ist aus diesem Grunde auch unbekannt, ob es sich um ein direktes Verhältnis handelt, derart, daß die von einem bestimmten Zellulosezersetzer bereitgestellten Zelluloseabbauprodukte durch den Stickstoffbinder unmittelbar verwertbar sind. Demnach ergab sich die Aufgabe, festzustellen, ob bei Verwendung eines bestimmten Zellulosezersetzers und eines bestimmten Stickstoffbinders unter genau bekannten Bedingungen symbiontische Beziehungen nachzuweisen sind. Dabei erschien es ratsam, als Zellulosezersetzer ein Bakterium zu wählen, das sowohl ein stark ausgeprägtes Zelluloseabbauvermögen als auch allgemeine Verbreitung besitzt und in einwandfreier Reinkultur züchtbar ist. Diese Eigenschaften kommen nach den obengenannten Forschern einzelnen Vertretern der Gattungen Cytophaga und Cellvibrio (Winogr.) zu. Als Stickstoffbinder wurden Vertreter der Gattung Azotobakter gewählt.

A. Experimenteller Teil.

I. Anreicherung von Zellulosezersetzern.

Um Reinkulturen geeigneter Zellulosezersetzer zu erhalten, mußte zunächst eine Bakterienflora gewonnen werden, die imstande war, in einer stickstofffreien Nährlösung mit Zellulose als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Es wurde versucht, aus verschiedenen Bodenproben (Gartenerde, Kompost, Pferdemist, Emscherbrunnen- und Teichschlamm) auf dem auch von früheren Untersuchern [van Iterson (1904), Christensen (1910), Cholodny (1933)] eingeschlagenen Wege aerobe Zellulosezersetzer heraus-

zuzüchten. Die verschiedensten synthetischen Nährlösungen mit Zellulose in Form von Filtrierpapier, reiner Watte, später auch „Zelluloseflocken" (Schleicher und Schüll) und Cellophan als Kohlenstoffquelle wurden reichlich mit den genannten Proben beimpft und die Kulturen bei Zimmertemperatur und bei 28° C gehalten. Später kamen auch höhere Temperaturen (50—60° C) zur Züchtung von thermophilen Zellulosezersetzern zur Anwendung. Weiterhin wurden auch nach dem Verfahren von Christensen Zellulosestreifen auf die verschiedenen, gut durchfeuchteten, in Petrischalen ausgebreiteten Bodenproben gelegt.

Da die von den verschiedenen Forschern (z. B. Dubois 1928, Sanborn und Hamilton 1928) vorgeschlagenen mineralischen Nährlösungen einander meistens sehr ähnlich sind, und da bei der Änderung der Zusammensetzung und der Konzentration der Nährsalze sich keine besseren Lebensmöglichkeiten der Zellulosebakterien ergaben, wurden zwei Grundlösungen, als A und B bezeichnet, von folgender Zusammensetzung verwendet:

Nährlösung A.	Nährlösung B.
0,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,5 g K_2HPO_4	0,2 g K_2HPO_4
0,1 g KCl	0,2 g NaCl
1000 g H_2O dest.	0,05 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
	0,005 g $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
	0,002 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
	0,001 g $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$
	0,005 g $Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$
	0,01 g $Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$
	1000 g H_2O dest.

Nährlösung B ist nach Schröder (1932) zusammengestellt. Sie enthält geringe Mengen bestimmter Schwermetallsalze und hat sich nach Schröder für die Stickstoffbindung durch Azotobakter als sehr günstig erwiesen.

Diese beiden „Grundlösungen", denen gebundener Stickstoff mangelte, wurden insbesondere bei den späteren Versuchen über das Zusammenarbeiten von stickstoffbindenden und zelluloselösenden Bakterien benutzt. Zur Züchtung von Zellulosebakterien wurde ihnen eine geeignete Stickstoffquelle, Ammonsulfat oder Natriumnitrat (je 0,2%) hinzugefügt, im Bedarfsfalle auch ein Überschuß von $CaCO_3$, um zu starke Säuerung zu vermeiden. Für die Anreicherung von Zellulosezersetzern kam auch eine Lösung in Anwendung, welche 0,2% $NaNO_3$ und 0,1% K_2HPO_4, gelöst in Leitungswasser, enthielt. In den Anreicherungskulturen wurde täglich auf Bakterienwachstum und Zellulosezerstörung geachtet. Es zeigte sich nach wenigen Tagen eine merkliche Zersetzung der Zellulose mit der eine Verfärbung einherlief. Es erschienen gelbe, orangefarbene, nicht selten auch rote oder braune, auch schwarze Flecke auf der Zellulose; die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die Gelb- und Orangefärbung auf Bakterien aus den Gattungen Cytophaga und Cellvibrio, die Schwarzfärbung aber auf Pilzwachstum hindeutete.

II. Reinzüchtung von Zellulosezersetzern.

Nachdem auf diese Weise eine Anreicherung von zellulosezersetzenden Spaltpilzen aus dem bunten Gemisch der Bodenbakterien vorausgegangen war, wurde unter Berücksichtigung der Erfahrungen anderer Forscher (Rippel und Flehmig 1933, Stapp und Bortels 1934 u. a.) zur Isolierung geschritten. Mit Hilfe des nach den Angaben von Scales (1916)

hergestellten Zelluloseagars[1]) wurde versucht, aus einer durch mehrmaliges Überimpfen gereinigten, sehr intensiv arbeitenden Rohkultur zelluloselösender Bakterien, in der sich neben anderen besonders reichlich ein kokkusartiges Gebilde und ein langes schmales Stäbchen befanden, diese zu isolieren.

Das aufgeschwemmte Material wurde in vier Verdünnungen in Petrischalen ausgegossen. Außerdem wurden Strichkulturen hergestellt, indem eine Öse der Aufschwemmung auf der Zelluloseagarschicht ausgespatelt wurde. Die Kulturen wurden dann teils bei Zimmertemperatur, teils bei 28—30° C aufbewahrt. Nach einigen Tagen zeigte das mikroskopische Präparat an den Zelluloseteilchen lange, dünne Stäbchen, die mit Kokken gemischt waren. Aber auch Kurzstäbchen mit lebhafter Eigenbewegung, sowie Mikrokokken hatten sich auf der Platte entwickelt. Auf diese Weise gelang es mir also nicht, zu Reinkulturen zu gelangen. Auch mit Hilfe des von Bokor (1930) angegebenen Gipsblockverfahrens (auch Rokitzkaja, 1933) gelangte ich nicht zum Ziel. Ferner ging ich derart vor, daß ich Zelluloseagar in eine sterile Petrischale ausgoß und nach dem Erkalten sterilisiertes Cellophan oder Filtriorpapier auf die Agaroberfläche brachte. Das Cellophan, bzw. Filtrierpapier saugte sich an den Agar an und blieb auf diese Weise feucht. Aber auch mit Hilfe dieser Methode ist es trotz zahlreicher Versuche nicht gelungen, einwandfreie Reinkulturen zu erhalten. Bessere Ergebnisse jedoch gestattete das Tonplattenverfahren, welches schon seit langer Zeit in der Bakteriologie angewendet (vgl. u. a. Heubült, 1929, Braun, 1930) und von Flehmig (1932) als Reinzüchtungsverfahren für Zellulosezersetzer mit Erfolg benutzt worden ist. Der Vorteil dieser Methode besteht, wie auch Flehmig betont, in der Möglichkeit der Ausschaltung aller organischen Verunreinigungen[2]). Die impfbereiten Platten (d. h. mit Nährlösung getränkte und mit Filtrierpapier oder Cellophan bedeckte, durch Behandeln mit Säure und Alkali zuvor gereinigte und ausgeglühte Tontellerstückchen in Petrischalen) wurden mit einer stark verdünnten Bakterienaufschwemmung, die viele Kokken und wenig Stäbchen enthielt, beschickt. Nach einigen Tagen erschienen auf dem Filtrierpapier bzw. Cellophan gelbe Flecken, deren mikroskopische Untersuchung wiederum die Kokken und Stäbchen, sonst aber keine Mikroorganismen ergab. Von solchen Kulturen wurden dann weitere Überimpfungen gemacht. Das Ergebnis blieb dasselbe. Die Fasern zeigten sich immer wieder mit jenen Kokken und Stäbchen bedeckt. Andere Bakterien zeigten sich nicht mehr. Abimpfungen auf Pepton-Fleischextraktagar (A. Meyer, 1903) ergaben kein Wachstum. Offenbar hatte ich also eine Art der Gattung Cytophaga in Reinkultur gewonnen.

Bekanntlich hat sich ein langwieriger Streit darüber entwickelt, ob jene Kokken und Stäbchen Entwicklungszustände desselben Organismus seien, oder ob es sich um zwei nur schwer voneinander zu trennende Arten handle. Auf Grund der Untersuchungen von Krzemieniewska (1933) und Stapp und Bortels (1934), in denen das Auskeimen der Mikrocysten[3]) zu Stäbchen und auch die Umbildung der Stäbchen zu Mikrocysten festgestellt werden konnte, halte ich sie für zusammengehörig, um so mehr, als es auch mir auf keine Weise gelingen wollte, sie voneinander zu trennen[4]).

In Anlehnung an die genannten Forscher, welche die Auskeimung der Mikrocysten zu Stäbchen unter dem Mikroskop direkt beobachtet haben, wurden Versuche angestellt; diese wollten mir allerdings nicht gelingen. Ich konnte nur so viel feststellen, daß sich aus den Mikrocysten im hängenden

[1]) Für die Herstellung des Zelluloseagars wurde gereinigter, d. h. mit 2 proz. HCl und 2 proz. NaOH behandelter und dann gewässerter Agar verwendet.

[2]) Denselben Vorteil bietet die Verwendung von Kieselsäureplatten, welche bereits Bojanovsky (1925) und auch Waksman und Carey (1926) mit Erfolg zur Isolierung zelluloselösender aerober Bakterien verwendet haben.

[3]) Die kokkenförmigen Zellen nennt Krezmieniewska (1933) Mikrocysten, während Hutchinson und Clayton (1919) dieses Entwicklungsstadium als „sporoid" bezeichnen.

[4]) Siehe dazu Hutchinson und Clayton (1919), v. Gescher (1920), Bojanovsky (1925), Winogradsky (1929 u. 1932), Krzemieniewska (1933), Rippel und Flehmig (1933), Wackenhut und Issatschenko (1934), Stapp und Bortels (1934).

Tropfen (Nährl. B) nach ca. 24 Std. Stäbchen entwickelt hatten, und auch das wurde nur dann beobachtet, wenn eine größere Menge von Cysten auf das mit einem Cellophanstückchen beschickte Deckglas übertragen worden war. Enthielt der hängende Tropfen nur wenig Cysten, so ließ sich keine Veränderung feststellen. Daraus geht hervor, daß im hängenden Tropfen nur ein kleiner Prozentsatz von Cysten auskeimt, was auch Stapp und Bortels gefunden haben, die einen Keimungsprozentsatz von 5—10 angeben. Ebenfalls in Übereinstimmung mit Stapp und Bortels fand ich dann weiter, daß im hängenden Tropfen ohne Zellulose kein Auskeimen der Mikrocysten stattfand, während Krzemieniewska bei der von ihr untersuchten Art auch ohne Beigabe von Zellulose Keimung beobachten konnte.

III. Morphologie und Physiologie des isolierten Zellulosezersetzers.

Um für die eigentlichen Versuche über die ernährungsbiologischen Wechselbeziehungen zwischen Zellulosezersetzern und Stickstoffbindern wohldefinierte Bedingungen zu schaffen, war eine genaue morphologische und physiologische Charakteristik der in Reinkultur gezüchteten Cytophagen unerläßlich.

1. Morphologie.

Die Entwicklung des Zellulosezersetzers in den Reinkulturen macht sich nach zwei bis drei Tagen bemerkbar. Kulturen, die in der üblichen Art durch Beimpfung eines aus der Flüssigkeit herausragenden Papierstreifens angesetzt waren, zeigten die Verfärbungen der Zellulose an der Grenze der Nährlösung, also dort, wo Feuchtigkeit und Sauerstoff optimale Bedingungen bieten. Die Entwicklung der Organismen an eben dieser Stelle ist ein Beweis dafür, daß sie aerophil sind[1]). Nach wenigen Tagen ist die Zellulose so stark angegriffen, daß der Filtrierpapierstreifen beim Schütteln der Kultur an der Stelle des stärksten Angriffes auseinanderfällt. Unter dem Einfluß der Zellulosezersetzer verwandelt sich die Zellulose in eine schleimartige Masse, welche, wie auch Rokitzkaja (1933) festgestellt hat, mit Chlorzinkjod keine Zellulosereaktion mehr gibt. Das mikroskopische Präparat zeigt in jungen Kulturen neben wenigen Mikrocysten gerade oder leicht gebogene Stäbchen mit verjüngten Enden. Ihre Größe wechselt zwischen 4—8 μ in der Länge und 0,2—0,3 μ in der Dicke[2]). Mit dem Alter der Kultur verschiebt sich die Zahl der Zellen zugunsten der Mikrocysten. Ältere Kulturen enthalten fast nur noch solche; sie haben einen Durchmesser

[1]) Versuche, den Zellulosezersetzer in sauerstofffreier Atmosphäre zu züchten, haben gezeigt, daß dieser Organismus längere Zeit, jedenfalls 14 Tage lang, unter Sauerstoffabschluß gehalten werden kann, ohne sichtbaren Schaden zu erleiden.

[2]) Zum Vergleich seien hier Daten von einigen anderen Forschern angeführt, die ähnliche Arten in Händen gehabt haben. Stapp und Bortels erhielten für ihre Mikrocysten bildende Art Werte von 3—6 μ für die Länge („zum Teil auch noch länger") und für die Dicke 0,2—0,3 μ. Reife Cysten besitzen einen Durchmesser von 1,3—1,6 μ. Krzemieniewska fand in jungen Kulturen 4—8 μ lange und 0,3 μ dicke Stäbchen bei Spirochaeta cytophaga und 3—6 μ×0,3 große bei Spirochaeta Hutchinsonii. Für den Durchmesser der Cysten erhält sie Werte von 1,3—1,6 μ. Von Gescher mißt 4—5 μ lange, 0,5—0,7 μ dicke Stäbchen. Der „Begleitkokkus" hatte einen Durchmesser von 0,8 μ. Ein anderer Stamm wies Stäbchen von derselben Länge auf; diese hatten jedoch einen Dickendurchmesser von 1,2 bis 1,6 μ.

von 1,2—1,5 µ. In jungen Kulturen färben sich die Stäbchen und Mikrocysten gut mit den gewöhnlichen Anilinfarben; Cysten und Stäbchen sind gramnegativ. Die für die Cytophagen charakteristische Beweglichkeit konnte auch bei der von mir isolierten Art beobachtet werden. Das beste Wachstum erfolgte bei einer Temperatur von 30—35° C. Ganz junge Kulturen, die noch keine Cysten enthalten, vertrugen ein 10 Minuten langes Erhitzen auf 55° C, während alte Kulturen, in denen sich fast ausschließlich Mikrocysten befanden, eine ebenso lange Erhitzung auf etwa 65° überdauerten[1]).

2. Physiologische Eigenschaften.

Bekanntlich ist für die Cytophagen ihre ausgeprägte Spezialisierung auf Zellulose kennzeichnend. In den meisten Versuchen verwendete ich käufliches Filtrierpapier. Sehr gutes Wachstum mit starker Zellulosezersetzung konnte auch mit der von Schleicher und Schüll bezogenen „Papiermasse in Flocken“ erzielt werden. Ebenso gut verwertbar war die Zellulose, die in Form von Filtertabletten (Schleicher und Schüll, Nr. 292) in den Handel kommt. Auch Ramiefasern und gefällte Zellulose wurden gut angegriffen. Andere ausgezeichnete Kohlenstoffquellen für Cytophaga sind Cellophan und Cellafilter; dagegen werden z. B. Membranfilter nicht angegriffen[2]). Auch Zelluloseazetat wird nicht verwertet.

In Kulturen, in denen die Zellulose durch andere Kohlenstoffquellen (Dextrin, Stärke, Zellobiose, Saccharose, Mannit, Glukose) in den Konzentrationen von 0,05, 0,1 und 0,5% ersetzt war, trat weder makroskopisch noch mikroskopisch erkennbares Wachstum auf, ein Ergebnis, das sich mit den Befunden anderer Forscher (Dubois, Stapp und Bortels, Hutchinson und Clayton, Rokitzkaja u. a.) deckt. Einen weiteren Beweis dafür, daß die genannten Kohlenstoffverbindungen nicht günstig auf das Wachstum von Cytophaga einwirken, gaben Versuche, in denen außer Zellulose steigende Mengen (0,01—1%) der obengenannten Kohlehydrate bzw. Alkohole verwandt wurden. Wie das Ergebnis, das in Tabelle 1 niedergelegt ist, zeigt, können diese Kohlenstoffverbindungen nicht nur von dem Organismus nicht ausgenutzt werden, sie wirken vielmehr zum Teil auch mehr oder minder hemmend auf das Wachstum der Zellulosezersetzer ein, wenn gleichzeitig Zellulose geboten wird.

Wenn auch das Wachstum der Cytophagen auf Zellulose in Gegenwart von verhältnismäßig hohen Konzentrationen von Dextrin, Stärke, Rohrzucker und zumal Mannit recht gut war, so mußte im Vergleich zu den Kontrollkulturen mit Zellulose als alleiniger Kohlenstoffquelle eine weniger starke Zellulosezersetzung festgestellt werden. Auf Grund der Ergebnisse von Hutchinson und Clayton ist es verständlich, daß die Bau-

[1]) Es seien hier einige Angaben über die Resistenz gegenüber höheren Temperaturen ähnlicher Arten anderer Forscher angeführt:

Die von Dubos (1928) untersuchte Art stellte das Wachstum bei 37° C ein; Hutchinson und Clayton (1919) geben für Spirochaeta cytophaga 62° C bei 5 Min., bzw. 58° C bei 10 Min. langer Erhitzung an. Krzemieniewska (1933) findet bei der von ihr untersuchten Art für die vegetativen Zellen beinahe dieselbe Widerstandsfähigkeit gegenüber höheren Temperaturen (bis 58° C) wie die Mikrocysten (bis 62° C). Die Stäbchen der von Stapp und Bortels untersuchten Mikrocysten bildenden Art werden dagegen durch 10 Min. langes Erhitzen auf 50° C und die Mikrocysten während derselben Zeit auf 67° C abgetötet.

[2]) Cellafilter bestehen nach Jander-Zakowski (1929) aus denitrierter Nitrozellulose, Membranfilter aus Nitrozellulosen, die ihrem Nitrierungsgrade nach zu den „Kollodiumwollen“ zu rechnen sind.

steine der Zellulose besonders stark hemmend auf das Wachstum von Cytophaga einwirkten, da, wie diese Forscher feststellten, sämtliche reduzierenden Zucker, die von ihnen untersucht wurden, schon in ganz geringen Konzentrationen das Wachstum von Cytophaga sistierten. In eigenen Versuchen (s. Tabelle 1) war das Wachstum bei einer Konzentration von 0,05% Zellobiose recht schwach, während die gleiche Menge Glukose schon genügte, um die Entwicklung gänzlich zu unterdrücken. Stapp und Bortels, die ähnliche Erfahrungen machten, schließen aus der Empfindlichkeit ihrer Cytophagen gegenüber Glukose und Zellobiose, daß sie die Zellulose nicht einmal bis zu Zellobiose abbauen. Weiter finden aber die genannten Forscher, daß Cytophagen in Symbiose mit anderen Bakterien viel weniger empfindlich gegenüber den beiden Zuckern sind. Auch ich kann bestätigen, daß bei Anwesenheit von Begleitbakterien Cytophaga die Zellulose noch in Gegenwart von 0,5% Glukose verwerten kann.

Tab. 1. Einfluß verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Zellulosezersetzung. (Stickstoffquelle $NaNO_3$. Wachstum nach 15 Tagen.)

Konzentrationen in %	Zellobiose	Glukose	Dextrin	Wasserlösliche Stärke	Saccharose	Mannit
0 mit Zellulose . . .	4	4	4	4	4	4
0,01 mit Zellulose . . .	2	1	4	4	4	4
0,05 mit Zellulose . . .	1	0	4	4	4	4
0,1 mit Zellulose . . .	0	0	4	4	4	4
0,5 mit Zellulose . . .	0	0	4	4	4	4
1,0 mit Zellulose . . .	0	0	3	2	3	3—4

4 = sehr starke Zellulosezersetzung. — 3 = starke Zellulosezersetzung. — 2 = schwache Zellulosezersetzung. — 1 = sehr schwache Zellulosezersetzung. — 0 = keine Zellulosezersetzung.

Weitere Versuche hatten das Ziel, klarzulegen, welchen Einfluß verschiedene Stickstoffverbindungen, anorganische wie auch organische, auf das Wachstum des von mir isolierten Zellulosezersetzers ausüben. Als Nährlösungen wurden die beiden Grundnährlösungen A und B (ohne Zusatz von $CaCO_3$) verwendet. Die verschiedenen Stickstoffquellen wurden in einer Konzentration von 0,1% zugegeben. Das Ergebnis zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2.

Wachstum nach 8 Tagen	Nährlösung enthält als Stickstoffquelle:					
	$NaNO_3$	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4NO_3	Asparagin	Pepton (Witte)	Harnstoff
Wachstum	4	2	2	Spur	1	0

Zunächst fällt das gute Wachstum bei Gegenwart von Salpeter auf, während die geprüften Ammoniumsalze ein viel schlechteres Wachstum ergaben. Es lag nahe, dieses schlechte Wachstum auf eine Reaktionsverschiebung nach der sauren Seite hin infolge der sich auswirkenden physiologischen Azidität des Ammonsulfates und Ammonnitrats zurückzuführen. So wurden weitere Versuche angestellt, bei denen unter sonst gleichen Be-

Tabelle 3.

Zeit in Tagen	$NaNO_3$ +		NH_4Cl +		$(NH_4)_2SO_4$ +		NH_4NO_3 +		Ammontartrat +	
		$CaCO_3$		$CaCO_3$		$CaCO_3$		$CaCO_3$		$CaCO_3$
7	2	3	1	1	1	3	1	3	1	1
16	4	4	1	4	1	4	2	4	1	1
21	4	4	1	4	1	4	3	4	1	1
30	4	4	1	4	1	4	2	4	1	1

dingungen $CaCO_3$ im Überschuß zugegeben wurde. Das Ergebnis dieses Versuches (Tabelle 3) bestätigte die Vermutung, daß die ungünstige Wirkung der Ammoniumsalze auf die Säuerung der Nährlösung zurückzuführen ist. Das ist eine Bestätigung früherer Angaben von Winogradsky (1929).

Von den organischen Stickstoffsubstanzen wird Pepton (Witte) nur schwach ausgenutzt. Hutchinson und Clayton hatten gefunden, daß Pepton in einer Konzentration von 0,1% noch Zellulosezersetzung erlaubt, 1% Pepton verhinderte aber das Wachstum. Auch Rokitzkaja findet, daß Pepton nur vertragen wird, wenn weniger als 1% geboten wird. Ähnliche Ergebnisse findet man bei Stapp und Bortels verzeichnet. Harnstoff war für unseren Organismus überhaupt nicht verwertbar, Asparagin in sehr geringfügigem Maße.

Um die Wachstumsintensität in Gegenwart verschiedener Stickstoffverbindungen vergleichen zu können, wurde in den Kulturen der obigen Versuchsreihe die abgebaute Zellulose annähernd bestimmt. Ich verwendete dazu die Methode von Bradley und Rettger (1927). Nach Beendigung des Versuchs wurde Salzsäure zur Nährlösung zugefügt, filtriert, der Rückstand mit destilliertem Wasser ausgewaschen, bei 105° C getrocknet und gewogen. Die in jeder Kultur ursprünglich vorhandene Zellulosemenge betrug 1 g. Der Versuch wurde nach 4 bzw. 5 Wochen abgebrochen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 4.

Tab. 4. Gelöste Zellulose in Gramm.

Versuchsdauer	$NaNO_3$	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl	$(NH_4)_2HPO_4$	Ammonoxalat	Ammontartrat
I. Versuch 4 Wochen	0,42	verunglückt	0,38	0,36	—	0,03
II. Versuch 5 Wochen	0,47	0,40	0,34	0,34	—	0,03

Weiterhin soll auf die fermentative Tätigkeit des von mir isolierten Zellulosezersetzers bei dem Zelluloseabbau hingewiesen sein, welche zur Beurteilung der im folgenden Abschnitt dieser Mitteilung behandelten Frage nach den ernährungsbiologischen Wechselbeziehungen zwischen Stickstoffbindern und Zellulosezersetzern von Wichtigkeit ist.

Winogradsky war es nicht gelungen, in Cytophagakulturen Abbauprodukte der Zellulose in Form reduzierender Substanzen (z. B. Glukose, Zellobiose) nachzuweisen; er hatte daraus geschlossen, daß die Cytophagen die Zellulose nicht hydrolytisch spalten, sondern oxydieren. Eigene Versuche, beim Zelluloseabbau durch Cytophaga reduzierende Stoffe zu finden,

Tabelle 3.

Ammonoxalat	+ $CaCO_3$	$(NH_4)_2HPO_4$	+ $CaCO_3$	Pepton	+ $CaCO_3$	Harnstoff	+ $CaCO_3$	Asparagin	+ $CaCO_3$	Tyrosin	+ $CaCO_3$
0	0	3	4	1	1	0	0	0	0	0	0
0	0	4	4	1	1	0	0	0	0	0	0
0	0	4	4	1	1	0	0	0	0	0	0
0	0	4	4	1	1	0	0	0	0	0	0

verliefen ergebnislos. Um festzustellen, ob dieses negative Ergebnis darauf zurückzuführen ist, daß eventuell auftretende reduzierende Zucker sofort weiterverarbeitet werden und sich darum dem Nachweis entziehen, wurde das von Pringsheim (1912) und Simola (1932) mit Erfolg benutzte sogenannte Sistierungsverfahren angewandt. Es besteht darin, daß man versucht, durch Zugabe von Toluol oder anderen Antisepticis das Wachstum und die sonstige Stoffwechseltätigkeit der Bakterien zu unterbinden, ohne daß die Tätigkeit der hydrolytischen Fermente wesentlich dadurch beeinträchtigt wird, wodurch es zu einer Anhäufung der durch die Hydrolyse gebildeten Stoffe kommen muß. Es wurde nach den Angaben Simolas (1932) verfahren, der mit dieser Methode in den Kulturen der von ihm benutzten „aeroben Zellulosebazillen" reduzierende Produkte der hydrolytischen Zellulosespaltung feststellen konnte.

Fünf Erlenmeyerkolben, die mit je 250 ccm Nährlösung A mit Natriumnitrat als Stickstoffquelle und 2% Zellulose in Form von Filtrierpapier beschickt waren, wurden mit Cytophagareinkulturen beimpft und, sobald kräftige Zellulosezersetzung zu beobachten war, mit Toluol versetzt. Dann wurde von Zeit zu Zeit aus den Lösungen eine Probe mit der Pipette entnommen und geprüft, ob sich die Ansammlung hydrolytischer Abbauprodukte des Zellstoffs durch eine Reduktion der Fehlingschen Lösung kundgeben würde.

Unter den genannten Versuchsbedingungen ließen sich keine reduzierenden Substanzen nachweisen, die auf zellulosespaltende Enzyme hätten schließen lassen. Dadurch wird die obengenannte Ansicht von Winogradsky gestützt, der annimmt, daß die Cytophagen die Zellulose zu Oxyzellulose oxydieren[1]).

Die Frage, mit welcher der in der Literatur beschriebenen Cytophagaarten die von mir gezüchtete Mikrocysten bildende Form identisch ist, kann erst mit Sicherheit entschieden werden, wenn sämtliche Stämme in vergleichenden morphologischen und physiologischen Untersuchungen geprüft würden. Nach den Ergebnissen der morphologischen und physiologischen Untersuchungen jedoch wird es sich höchstwahrscheinlich um die von Stapp und Bortels (1934) isolierte und als Cytophaga globulosa bezeichnete, Mikrocysten bildende Art handeln.

Die hier beschriebene Cytophaga wurde nun mit Reinkulturen von Azotobakter kombiniert. Als Stickstoffbinder wurden 2 Stämme von Azotobacter chroococcum verwandt; beide Stämme erwiesen sich in den mit ihnen angestellten Versuchen in Gegenwart von Glukose als gute Stickstoffbinder.

[1]) Nur in Kulturen der Cytophaga, die zufällig mit anderen Bakterien verunreinigt waren (Kokken, lebhaft bewegliche Kurzstäbchen usw.), ließen sich gelegentlich reduzierende Stoffe mit Fehlingscher Lösung nachweisen (siehe weiter unten!).

IV. Versuche über die Verwertbarkeit der Zellulose als Energiequelle für stickstoffbindende Bakterien in Mischkulturen von Azotobakter mit Cytophaga.

1. Methodik der Stickstoffbestimmung.

Die quantitative Bestimmung des Gesamtstickstoffs der Bakterienkulturen wurde nach Kjeldahl mit Hilfe der Mikromethode nach Pregl ausgeführt. Die Kulturen wurden für die Stickstoffanalysen wie folgt vorbereitet: Es wurde solange konzentrierte Schwefelsäure (Merck pro analysi) zugesetzt, bis die Zellulose oben gelöst war. Die Menge der Schwefelsäure richtete sich jeweils nach der Zellulosemenge; meist genügten 10—15 ccm. Der Inhalt des Erlenmeyerkolbens wurde dann quantitativ in einen 100 ccm Meßkolben überführt und bis zur Marke aufgefüllt. Die Zellulose fällt infolge des Wasserzusatzes in ganz feiner Form aus, so daß nach Schütteln des Kolbens mit der Pipette aus der gleichmäßigen Aufschwemmung eine gute Durchschnittsprobe entnommen werden kann. Der Schwefelsäurezusatz für die Auflösung der Zellulose wurde von der für den Aufschluß benötigten Schwefelsäuremenge abgezogen. Die in den Tabellen angegebenen Werte sind stets Durchschnittswerte von zwei Kulturen. Von jedem Kolben wurden zwei Parallelanalysen ausgeführt. Die Differenz gegenüber dem Stickstoffgehalt unbeimpfter Kontrollkolben ergab den Stickstoffgewinn. Die ermittelten Stickstoffwerte wurden einheitlich auf 100 ccm umgerechnet.

Bekanntlich (vgl. Keyssner und Tauböck, in Kleins Hdb. d. Pflanzenanalyse, IV, 3, S. 1364 ff., 1933) ergibt sich bei der Kjeldahlanalyse von solchen Lösungen, welche Nitrate und organische Stoffe gleichzeitig enthalten — und bei einem kleinen Teil der von mir zu analysierenden Nährlösungen war das der Fall (vgl. weiter unten) — die Schwierigkeit, daß die bei dem Aufschluß eintretende Verkohlung der organischen Substanz eine Reduktion der Schwefelsäure zu schwefliger Säure bewirkt, die ihrerseits die noch vorhandenen Nitrate zu Ammoniak reduzieren kann. Um nachzuweisen, daß deshalb auch in eigenen Versuchen, soweit die Lösungen Nitrate und organische Stoffe (Filtrierpapier usw.) enthielten, mittels Kjeldahl eine höhere Stickstoffausbeute erzielt wird als in solchen Lösungen, welche entweder nur organische Stoffe oder nur Nitrate oder weder die ersteren noch die letzteren enthalten, habe ich eine ganze Anzahl von Stickstoffbestimmungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Tab. 5 zusammengestellt sind. Wie aus der Tabelle erhellt, waren die Stickstoffwerte der Lösungen mit Nitrat und organischen Stoffen stets höher als die Stickstoffausbeuten der Lösungen je eines der beiden Stoffe. Weiter zeigt die Tabelle, daß die Nitratlösungen frei sind von anderen Stickstoffverbindungen, denn sie ergeben nicht mehr Stickstoff als dest. Wasser. Desgleichen ist die für die Versuche benutzte Glukose praktisch stickstofffrei.

Tabelle 5.

Versuch	Dest. Wasser	+ 0,2% $NaNO_3$	Zellulose 0,5%		Mannit 1%		Glukose 1%		Lösl. Stärke 1%		Kohle 1%	
			ohne $NaNO_3$	+ 0,2% $NaNO_3$	ohne $NaNO_3$	+ 0,1% $NaNO_3$	ohne $NaNO_3$	+ 0,2% $NaNO_3$	ohne $NaNO_3$	+ 0,1% $NaNO_3$	ohne $NaNO_3$	+ 0,1% $NaNO_3$
1	0,14	0,19	0,21	0,84	0,11	1,12	0,14	0,98	0,11	1,82	0,75	2,66
2	0,14	0,14	0,18	0,78	0,11	0,91	0,14	0,84	0,12	1,40	0,82	2,35
3	0,14	0,14	0,29	1,16	0,10	1,12	0,14	0,98	0,11	1,48	0,86	2,45
4		0,18	0,28	1,35			0,14	0,98			0,75	2,98
5		0,14	0,18	1,87			0,14	0,84			0,75	2,66
6		0,18	0,18	1,05							0,75	2,45
7		0,14	0,24	0,98							0,75	2,35
8		0,14	0,24	0,84								
9		0,18	0,18	0,98								
10		0,14	0,21	0,98								

Wie Tabelle 5 zeigt, enthält das Filtrierpapier allerdings geringe Mengen von Stickstoffverbindungen, wie das durch die Untersuchungen von Fitting (1928)

und Engel (1929) bekannt ist[1]). Es ergab sich daraus die Notwendigkeit, in denjenigen Fällen, in welchen in den beimpften Kolben Nitrat und Kohlehydrat nicht restlos verbraucht waren, den in Blindversuchen für die Mischlösung (d. h. Nitrat und Kohlehydrat) gefundenen Stickstoffwert von dem in den beimpften Kulturen ermittelten abzuziehen, während dann, wenn Nitrate und Kohlehydrate im Versuche restlos aufgebraucht waren (bzw. Nitrate gar nicht zugegeben worden waren), nur der für die anderen Komponenten der Lösung gefundene Stickstoffwert in Abzug zu bringen war. Dieser letztere betrug im Mittel aller Bestimmungen 0,14 mg in 100 ccm, für Kombinationen von Nitrat und organischen Stoffen ca. 1 mg; nur der für Kohle lag wesentlich höher. So wurde nun vermieden, zu hohe Stickstoffwerte in den Kulturen mit Nitrat und organischen Stoffen zu buchen; eine kleine Ungenauigkeit liegt allerdings darin, daß die während der Dauer der Versuche verbrauchten und nicht genau bestimmten Anteile der ursprünglich zugesetzten Nitrate und organischen Stoffe nicht berücksichtigt wurden.

2. Versuchsergebnisse.

a) Versuche mit kombinierten Reinkulturen von Azotobacter chroococcum und Cytophaga.

Zur Beantwortung der Frage, inwieweit Azotobakter Zellulose als Kohlenstoffquelle in Gegenwart von zellulosezersetzenden Bakterien verwerten kann, wurden zunächst orientierende Versuche angestellt. Eine Reihe von 100 ccm Erlenmeyerkölbchen wurde zum einen Teil mit Nährlösung A (je 25 ccm) und 2% Zellulose in Form von „Zelluloseflocken", zum andern Teil mit Nährlösung B, ebenfalls 25 ccm und derselben Zellulosemenge beschickt. Nach der Sterilisierung im Dampftopf wurden die Lösungen mit Cytophaga und Azotobakter beimpft und bei 30° C aufbewahrt. Die Kulturen wurden täglich auf Wachstum beobachtet; aber selbst nach Wochen hatte in solchen Kölbchen kein Wachstum stattgefunden. Nach den Erfahrungen von H. Pringsheim war dieses Ergebnis jedoch nicht verwunderlich. Dieser Autor hat nämlich darauf hingewiesen, daß man zur Einleitung der Stickstoffbindung in solchen Kulturen geringe Mengen eines für den Stickstoffbinder geeigneten Kohlenhydrates zusetzen müsse. Seinem Beispiel sind dann alle anderen Forscher, die sich mit dieser Frage befaßt haben, gefolgt. Um das Wachstum von Azotobakter anzuregen, wurde dann in Ergänzung der obengenannten Versuche noch eine Anzahl weiterer angesetzt, in denen die gleichen Nährlösungen, aber mit Zusatz von 0,01, 0,05 und 0,1% Glukose zur Verwendung kamen. In dieser Versuchsreihe enthielten die Kolben je 50 ccm Nährlösung. Nach 20 Tagen (die Zuckerreaktion war bereits nach 8 Tagen negativ) wurde zur Untersuchung und Verarbeitung dieser Kulturen geschritten. Die mikroskopische Kontrolle ergab entsprechend der Glukosezugabe ein geringes Azotobakterwachstum; Zellulosezersetzung war aber nicht zu beobachten. Eine Anzahl von Kulturen wurde dann für die Stickstoffanalyse verwendet; die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tab. 6. Stickstoffbindung in Mischkulturen von Azotobakter und Cytophaga.

Konzentration der Glukose	Stickstoffgehalt der Kulturen in mg	Stickstoffgewinn in 100 ccm in mg
0,01 %	0,18	0,12
0,05 %	0,57	0,90
0,1 %	1,05	1,86
unbeimpft	0,12	

[1]) Schleicher und Schüllsche Filter von 5½ ccm Durchmesser enthalten nach Engel (1929) durchschnittlich 0,032 mg Stickstoff.

Die ermittelten Werte lassen erkennen, daß nur soweit Entwicklung stattgefunden hatte, als eine für Azotobakter verwertbare Energiequelle zur Verfügung stand.

Die nächste Versuchsreihe wurde unter denselben Bedingungen angesetzt, jedoch wurde an Stelle der Glukose 0,02% $NaNO_3$ hinzugegeben, um den Prozeß der Zellulosezersetzung einzuleiten, wobei aber zu bedenken ist, daß auch Azotobakter sich des Nitrates bedienen kann. Die nach 4 Wochen untersuchten Kulturen zeigten ein mittelmäßiges Wachstum des Zellulosezersetzers, während Azotobakter nicht einmal mikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Die Nitratreaktion mit Diphenylaminschwefelsäure verlief negativ. Das gleiche Ergebnis konnte durch weitere Versuchsreihen sichergestellt werden. Von einer solchen Reihe wurden Stickstoffanalysen ausgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 7 wiedergegeben sind.

Tab. 7. (Versuchsdauer: 4 Wochen.)

Kolben Nr. 1	3,96	mg Stickstoff	in	100	ccm
„ „ 2	3,72	„	„	100	„
„ „ 3	3,54	„	„	100	„
„ „ 4	3,72	„	„	100	„
„ „ 5	3,84	„	„	100	„
„ „ 6	3,40	„	„	100	„
„ „ 7	3,78	„	„	100	„
„ „ 8	3,64	„	„	100	„
„ „ 9	3,48	„	„	100	„
Mittelwert	3,67	„	„	100	„
Unbeimpfte Nährlösung + 2% Zellulose (Kontrolle)	0,18	„	„	100	„
Mittlerer Stickstoffgehalt (= Bakterien-Stickstoff) nach Abzug der Kontrolle	3,49	„	„	100	„

Die in Tabelle 7 angeführten Resultate zeigen deutlich, daß der den Kulturen beigegebene Nitratstickstoff der wachstumsbegrenzende Faktor gewesen ist. Die zugefügte Natriumnitratmenge enthält 3,3 mg Stickstoff in 100 ccm, das ist ziemlich dieselbe Menge, die nach Beendigung des Versuches in Form von Zellsubstanz festgelegt worden war. Hieraus darf geschlossen werden, daß mit dem Verbrauch des Nitrates jegliches weitere Wachstum der Cytophaga aufgehört hat und daß keine Stickstoffbindung eingetreten ist, da Azotobakter offenbar etwaige bei der Zersetzung der Zellulose entstandene Abbauprodukte nicht zu verwerten vermochte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden nun zu den Nährlösungen sowohl geringe Mengen von Glukose (0,1%) zur Anregung des Azotobakterwachstums, als auch geringe Mengen von Nitrat ($NaNO_3$ 0,02%) hinzugefügt, um die Einleitung des Zelluloseabbaus zu ermöglichen, und zwar wurden in diesen Versuchen analytisch genau festgestellte Nitratmengen zur Nährlösung gegeben. Im übrigen war die Versuchsanordnung dieselbe wie bei den vorigen Versuchen. Bei der nach 4 Wochen vorgenommenen Untersuchung war schon makroskopisch ein Wachstum in den Kulturen an der geringfügigen Verfärbung der Zellulose zu erkennen. Die mikroskopische Untersuchung ergab sowohl Azotobakterzellen als auch an den stark angegriffenen Zellulosefasern Cytophagazellen. Nach dem Verbrauch der Glukose mußte jegliche weitere Entwicklung von Azotobakter aufhören, es sei denn, daß diesem durch die Tätigkeit der Cytophagen neue Energiequellen erschlossen worden wären. Wäre dieses der Fall gewesen, dann hätte sich bei der Analyse die mit weiterem Azotobakterwachstum verbundene Stick-

stoffbindung in Stickstoffwerten auswirken müssen, welche über den der zugefügten Nitratmenge entsprechenden Stickstoffwerten gelegen hätten. Ebenso hätte ein weiterer Zelluloseabbau nach Verbrauch des Nitrates sich in höheren Stickstoffwerten zeigen müssen (vgl. Tabelle 8). Da dies jedoch nicht der Fall war, muß angenommen werden, daß auch unter diesen Versuchsbedingungen weder Azotobakter die von Cytophaga erschlossenen Kohlenstoffquellen, noch Cytophaga den von Azotobakter gebundenen Stickstoff innerhalb der Kulturzeit verwandt hat.

Tab. 8. Ergebnis der Kjeldahl-Bestimmungen in mg N in 100 ccm Nährlösung. Versuchsdauer: 30 Tage.
Zusatz zur Nährlösung: $NaNO_3$ 0,02%, Glukose 0,1%, Zellulose 2%.

Beimpfung	Kolben Nr.	Reaktion auf Zucker	Reaktion auf Nitrat	Nährlösung A	Nährlösung B
Cytophaga + Azotobacter chrooc.	1	negativ	negativ	3,18	3,24
	2	,,	,,	3,04	3,28
	3	,,	,,	3,40	3,32
	4	,,	,,	3,12	3,56
			Mittelwert:	3,18	3,35
			Kontrolle:	0,14	0,14
Mittlerer N-Gehalt nach Abzug der Kontrolle:				3,04	3,21
Azotobacter chrooc.	1	negativ	positiv	1,88	1,95
	2	,,	,,	1,68	2,12
	3	,,	,,	1,70	1,85
	4	,,	,,	1,91	1,93
			Mittelwert:	1,79	1,96
			Kontrolle:	0,14	0,14
Mittlerer N-Gehalt nach Abzug der Kontrolle:				1,65	1,82

Zur Sicherstellung der in den vorigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse wurde eine weitere Versuchsreihe mit gleicher Methodik angesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Hier wurden Glukose und Zellulose als Kohlenstoffquellen entweder jede für sich allein oder beide kombiniert dargeboten; in dem einen Falle fehlte gebundener Stickstoff, den andern Kulturen wurde 0,02% $NaNO_3$ beigefügt. Ein Teil der Kolben wurde mit Azotobakter, ein anderer mit Cytophaga, ein dritter mit beiden Organismen beimpft. Die Versuchsdauer betrug 4 Wochen. Wegen aller weiterer Einzelheiten sei auf die Tabelle verwiesen, aus der auch zu ersehen ist, ob die zugegebene Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle während der Versuchsdauer verbraucht worden ist oder nicht. Als Hauptergebnis mag erwähnt sein, daß in den Kulturen, welche geringe Mengen von Glukose und Nitrat enthielten, zwar zunächst Azotobakterwachstum und Zellulosezersetzung stattgefunden hatte, daß aber mit dem Verbrauch der zugegebenen Kohlenstoff- und Stickstoffmengen sowohl der Prozeß der Zellulosezersetzung als auch das Azotobakterwachstum aufhörte. Auf ein symbiontisches Zusammenwirken von Azotobakter und Cytophaga kann also auch aus dieser Versuchsreihe nicht geschlossen werden.

Es besteht nun die Möglichkeit, daß die beiden lebenden Kulturen infolge ungleicher Kräfteverhältnisse sich einander stören. Daher wurden weitere Versuche mit abgeänderter Methodik durchgeführt, bei welchen die

Tabelle 9.

Zusatz zur Nährlösung	Beimpfung	Reaktion auf		mg N pro 100 ccm			
				Nährlösung		Nach Abzug der Kontrolle	
		Zucker	Nitrat	A	B	A	B
1% Glukose	Azotobacter chrooc.	negativ	—	9,2 9,0 10,0	14,6 14,4 15,4		
			Mittel:	9,4	14,8	9,2	14,6
1% Glukose + 2% Zellulose	Azotobacter chrooc.	negativ	—	10,2 9,8 9,4	13,8 14,4 14,4		
			Mittel:	9,8	14,2	9,6	14,0
Kontrolle	unbeimpft	positiv	—	0,2	0,2		
2% Zellulose + 0,2% $NaNO_3$	Cytophaga	—	positiv	21,0 21,2 23,2	25,1 23,8 23,4		
			Mittel:	21,8	24,1	20,8	23,1
Kontrolle	unbeimpft	—	positiv	1,0	1,0		
0,1% Glukose + 0,02% $NaNO_3$	Azotobacter chrooc. + Cytophaga	negativ	positiv	2,1 2,1 1,8	2,1 2,3 2,5		
			Mittel:	2,0	2,3	1,2	1,5
Kontrolle	unbeimpft	positiv	positiv	0,8	0,8		
0,1% Glukose + 0,02% $NaNO_3$ + 2% Zellulose	Azotobacter chrooc. + Cytophaga	negativ	negativ	2,9 3,4 3,0	3,5 3,0 3,4		
			Mittel:	3,1	3,3	2,96[1])	3,16[1])

[1]) In diesem Falle ist nur der Stickstoffwert von 0,14 mg (vgl. S. 11) in Abzug zu bringen.

Versuchsanordnung außerdem noch die Gewähr bot, daß die für jeden der beiden Symbionten notwendigen Stoffe in ausreichender Menge vorhanden waren[1]). Gut gewachsene Azotobakter-Kulturen in Nährlösung A und B, zu der 2% Zellulose und 1% Glukose hinzugefügt waren, wurden nach Ver-

[1]) Bekanntlich werden von den Azotobakterzellen lösliche Stickstoffverbindungen an die Nährlösung abgegeben. Neuerdings konnte Roberg (1935) in 100 ccm Nährlösung nach einer 36 tägigen Kulturdauer 17 mg löslichen Stickstoff nachweisen; davon lagen 0,28 mg in Form von Ammoniak vor. In einem anderen Falle stellte er nach einer Kulturdauer von 31 Tagen einen Gesamtstickstoffgehalt von 22,5 mg fest, davon waren 3,09 mg einschließlich 0,63 mg Ammoniak in gelöster Form. Eine andere Kultur, die 18,48 mg Gesamtstickstoff aufwies, wovon 1,52 mg gelöst waren, zeigten nach Abtötung der Kulturen durch Kochen pro 100 ccm folgende Werte:

Vor dem Kochen: 1,52 mg im Filtrat.

Nach dem Kochen:

a) nach 24 Std. 3,29 mg im Filtrat Zunahme von annähernd 115%.

b) „ 7 Tagen 4,41 mg im Filtrat Zunahme von annähernd 189%.

Ammoniak trat immer erst dann auf, wenn die Kohlenstoffquelle verbraucht war.

[2]) Nach den Ergebnissen von Roberg, der nach Kochen von Azotobakterkulturen eine Stickstoffzunahme im Filtrat feststellen konnte, mußte sich die Sterilisation in bezug auf die Stickstoffquelle günstig auswirken.

brauch der Glukose im Autoklaven sterilisiert[2]), mit Cytophaga beimpft und dann bei 30° C aufbewahrt. Doch ließ sich auch nach mehreren Wochen keine Zellulosezersetzung in derartigen Kulturen nachweisen, sei es, daß die von Azotobakter vorher abgegebenen Stickstoffverbindungen der Menge nach nicht ausreichten, sei es aus anderen, unbekannten Gründen. Auch in umgekehrten Versuchen, in welchen gut gewachsene Cytophaga-Kulturen nach Abtötung der Zellulosezersetzer mit Azotobakter beimpft wurden, verliefen negativ, d. h. es blieb in ihnen jedes Azotobakterwachstum aus, wenn die voraufgegangene Sterilisation im Dampftopf erfolgt war. Ein geringfügiges Wachstum, welches dann zu beobachten war, wenn die Sterilisation im Autoklaven vorgenommen worden war, ist vielleicht durch die Annahme zu erklären, daß unter Druck die Abbauprodukte der Zellulose z. T. in eine für Azotobakter verwertbare Form übergehen. Diese zuletzt genannten Versuche bestätigen das Ergebnis der früheren und drängen zu der Annahme, daß weder die bei der Zellulosezerstörung durch Cytophaga entstehenden Abbauprodukte eine für Azotobakter nutzbare Kohlenstoffquelle darstellen, noch Azotobakter Stickstoffverbindungen liefert, die für Cytophaga direkt und unmittelbar verwertbar sind.

Es blieb nun noch der Versuch übrig, durch Zufügung bestimmter katalytisch wirksamer Stoffe ein symbiontisches Zusammenwirken von Cytophaga und Azotobakter zu erzwingen. Aus der Beobachtung, daß Azotobakter-Kulturen mit der Grundlösung B höhere Stickstoffausbeuten ergaben (vgl. Tabelle 9), die, wie von Bortels (1930) festgestellt und von Schröder (1932) bestätigt wurde, auf der Anwesenheit von Molybdän und anderen Stoffen beruht, ergab sich für mich zuerst die allgemeine Fragestellung nach dem Einfluß verschiedener, bei physiologischen Prozessen als wirksam beschriebener Stoffe und Stoffgemische auf ein vermutetes Symbioseverhältnis zwischen Stickstoffbindern und Zellulosebakterien. Zur Beantwortung der Frage, ob die bei der Stickstoffbindung günstig wirkenden Schwermetalle spezifisch wirken oder ob sie vielleicht durch andere Stoffe wie Progynon oder solche, die im Hefeextrakt vorhanden sind, ersetzt werden können, wurden zunächst Vorversuche mit Reinkulturen von Azotobakter angesetzt. Als Nährlösungen wurden dabei die Grundlösungen A und B, ferner die Nährlösung von Beijerinck (1903) und die von Winogradsky (1902) verwendet.

b) Einfluß von Progynon auf die Stickstoffbindung durch Azotobakter.

Eine Anzahl 200-ccm-Kolben wurden mit je 50 ccm der genannten Nährlösungen beschickt. Der p_H-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. Der Glukosegehalt betrug 2%. Als Progynon stand ein technisches Präparat in Form einer wäßrigen Lösung zur Verfügung, das in Ampullen von Schering und Kahlbaum in den Handel kommt. Nach Angabe der Firma enthält eine Ampulle, in der 1 ccm enthalten ist, 100 M.E. Nach den Untersuchungen von Schöller und Göbel (1932) enthält die Lösung neben Follikelhormon lipoide Begleitstoffe und etwas Kochsalz. Weiter teilt Schöller mit, daß nach Kögl (1933) im technischen Progynon auch stets das Phytohormon Auxin vorhanden ist. Den sterilisierten Kölbchen wurden je a) 10 M.E. oder b) 20 M.E. beigegeben. Nach Beimpfung mit Azotobacter chroococcum wurden die Lösungen bei 28° C

aufbewahrt. Die Versuchsdauer betrug 16 Tage. Das Ergebnis ist in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tab. 10. Stickstoffbindung in mg durch Azotobakter in Gegenwart von Progynon.

Angewandte M.E.		Nährlösung A	Nährlösung B	Beijerincksche Nährlösung	Winogradskysche Nährlösung
unbeimpfte Kontrolle	0	0,20	0,14	0,28	0,24
	10	0,20	0,24	0,28	0,24
	20	0,24	0,20	0,32	0,24
beimpft	0	12,32	21,10	8,20	8,30
	nach Abzug	12,12	20,96	7,92	8,06
	10	12,90	20,80	8,40	7,80
	nach Abzug	12,70	20,56	8,12	7,56
	20	verunglückt	20,20	7,90	5,20
	nach Abzug		20,00	7,58	4,96

Tabelle 10 zeigt, daß Progynon auf die Stickstoffbindung durch Azotobakter keinen günstigen Einfluß ausübt. Nach Zufügung von 20 M.E. war in der Winogradsky-Lösung sogar eine Hemmung der Stickstoffbindung zu verzeichnen.

c) Einfluß von Hefeextrakt auf die Stickstoffbindung durch Azotobakter.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei den vorigen Versuchen. Der Hefeextrakt wurde nach den Angaben von Burgeff (1934) hergestellt. Die aus 100 g Bäckerhefe erhaltene Extraktausbeute betrug 1,6 g. Von diesem Rohextrakt wurden steigende Mengen (1,6; 4,8 und 48 mg) zu 100 ccm Nährlösung gegeben. Da der Hefeextrakt nach den Angaben der Literatur thermostabil ist, wurde er vor der Sterilisation zugefügt. Als Impfmaterial diente wiederum Azotobacter chroococcum. Die Dauer des Versuches betrug 14 Tage. Die Ergebnisse zeigt Tab. 11. Wie aus der Tabelle hervorgeht, verlief zwar die Stickstoffbindung in Lösung B kräftiger als in Nährlösung A, sie konnte aber durch Zugabe von Hefeextrakt nicht gefördert werden.

Tab. 11. Stickstoffbindung durch Azotobacter in Gegenwart von Hefeextrakt.

	Nährlösung A				Nährlösung B				Nährlösung nach Beijerinck				Nährlösung nach Winogradsky			
	ohne Extr.	+ Extrakt in mg 1,6	4,8	48,0	ohn. Ext.	+ Extrakt in mg 1,6	4,8	48,0	ohne Extr.	+ Extrakt in mg 1,6	4,8	48,0	ohne Extr.	+ Extrakt in mg 1,6	4,8	48,0
unbeimpft (Kontrolle)	0,14	0,5	1,4	9,8	0,2	0,5	1,4	9,8	0,24	1,1	1,6	9,5	0,24	0,78	1,4	9,8
beimpft	10,0	10,5	10,5	19,3	20,9	19,9	20,9	31,4	9,6	9,3	9,0	16,5	10,92	11,3	12,6	21,6
Nach Abzug d. Kontrolle	9,86	10,0	9,1	9,5	20,7	19,4	19,5	21,6	9,36	8,2	7,4	7,0	10,68	10,52	11,2	11,8

Die den Schwermetallen, wie Molybdän usw., eigene günstige Wirkung auf die Bindung des Stickstoffs konnte also durch Progynon oder Hefeextrakt in diesen Versuchen nicht ersetzt werden.

Eine zweite Versuchsreihe mit Zusatz von Hefeextrakt führte zu demselben Ergebnis, das hiernach als gesichert betrachtet werden darf. Trotz des negativen Ausfalls der hier geschilderten Versuche wurden dann noch weitere angesetzt, in welchen die mit Zellulose und mit Progynon bzw. Hefeextrakt versehenen Lösungen gleichzeitig mit Reinkulturen von Azotobakter und Cytophaga beimpft wurden. Aber auch in solchen Kulturen war es nicht möglich, eine symbiontische Tätigkeit der beiden Organismen zu erzielen. Von einer Wiedergabe der in diesen Kulturen erhaltenen Stickstoffwerte kann darum abgesehen werden.

Bei Verwendung von kombinierten Reinkulturen von Cytophaga und Azotobakter konnte selbst bei mannigfachster Abänderung der Versuchsbedingungen keine symbiontische Tätigkeit von Azotobakter und Cytophaga erzielt werden. Der Widerspruch der hier mitgeteilten Ergebnisse mit den positiven Befunden anderer Forscher (siehe Einleitung!) dürfte wohl z. T. darauf zurückzuführen sein, daß nicht immer mit einwandfreien Reinkulturen gearbeitet worden ist. Naturgemäß sind die an dem von mir isolierten Zellulosezersetzer gemachten Erfahrungen nicht ohne weiteres auf andere Arten übertragbar. In Ergänzung der hier durchgeführten Untersuchungen wäre noch die Frage zu klären, ob vielleicht mit anderen Stickstoffbindern in Gemeinschaft mit anderen Zellulosezerstörern eine symbiontische Tätigkeit zu erzielen ist. Was den Stickstoffbinder betrifft, so wird man wohl immer in erster Linie an Azotobakter denken, wenn man nicht anaerobe Spaltpilze verwenden will. Als Zellulosezersetzer kämen aber, sofern nicht thermophile oder anaerobe Arten, mit denen Pringsheim gearbeitet hat, in Frage kommen, zweifellos die Cellvibrionen (Winogr.) in Betracht, die nach vorliegenden Literaturangaben neben jenen als ganz besonders energische, aerobe Verarbeiter der Zellulose gelten dürfen. Für die Verhältnisse in der freien Natur, denen die oben gemachte Annahme eines komplizierten Symbiosekreises ja auch eher entspräche als eine direkte Wechselwirkung zwischen Cytophaga und Azotobakter, besteht schließlich noch eine weitere Möglichkeit, daß nämlich unter anderen Umweltverhältnissen Abbau der Zellulose und Stickstoffbindung in anderer Weise verliefe als unter den hier angegebenen Versuchsbedingungen und daß vielleicht die Stoffwechselprodukte beider Arten wechselseitig direkt assimilierbar wären.

B. Rohkulturversuche.

Wenn auch in kombinierten Reinkulturen von Azotobakter und Cytophaga unmittelbare symbiontische Wechselbeziehungen zwischen diesen beiden Organismengruppen nicht nachzuweisen waren, so besteht doch die Möglichkeit, daß durch die Tätigkeit von Begleitbakterien die beiderseitigen Stoffwechselprodukte umgewandelt und in eine für die beiden Mikroorganismen verwertbare Form überführt werden; dann müssen Zellulose enthaltende Rohkulturen, in denen neben solchen Begleitbakterien Stickstoffbinder und Zellulosebakterien gemeinschaftlich arbeiten, Stickstoffgewinne ergeben, was ja auch nach vielen Angaben in der Literatur (A. Koch, 1910; Hutchinson und Clayton, 1919; Tuorila, 1928 u. a., siehe Einleitung) zutrifft. Hieraus ließ sich folgern, daß nicht nur zwei, sondern mehrere Symbionten in den Kreislauf einzubeziehen wären.

Alfred Koch hat sich bereits 1910 zu diesen Fragen folgendermaßen ausgesprochen: „Vielleicht bilden verschiedene zelluloselösende Bakterien aus Zellulose verschiedene Produkte, von denen nur manche den stickstoffbindenden Bakterien als Energiequelle dienen können. Oder es ist bei diesen Vorgängen das Tempo der Zellulosevergärung mitbestimmend, in dem Sinne, daß nur bei schnell verlaufender Umsetzung der Zellulose von den dann reichlich vorhandenen Umsetzungsprodukten auch die stickstoffbindenden Bakterien einen Teil abbekommen, während bei sparsam erfolgender Bildung der Abbauprodukte der Zellulose diese von anderen Bakterien, z. B. den salpeterumsetzenden, aufgefressen werden“ (S. 6).

Von den beiden Erklärungsmöglichkeiten Kochs dürfte der ersteren die größere Wahrscheinlichkeit zukommen, da in eigenen Versuchen bei Beimpfung von gut gewachsenen, dann sterilisierten Cytophaga-Kulturen, in denen wohl eine hinreichende Anhäufung von Zellulose-Abbauprodukten anzunehmen ist, auch bei völligem Fehlen von anderen Bakterienarten, die sich dieser Produkte bedienen könnten, jegliches Azotobakter-Wachstum unterblieb.

Um nun festzustellen, ob, wie es von den oben genannten Autoren angegeben ist, statt einer direkten Wechselwirkung kompliziertere symbiontische Beziehungen bei Mitwirkung anderer Organismenarten zwischen Stickstoffbindung und Zelluloseabbau bestehen, ob also auf einem anderen Wege die Zellulose als Kohlenhydratquelle den Stickstoffbindern nutzbar gemacht werden kann, wurden noch die folgenden Versuche mit Rohkulturen angesetzt, und zwar teils als Erdkulturversuche, teils als Nährlösungsversuche. In allen diesen Rohkulturversuchen dürften in erster Linie neben Cytophagen noch Cellvibrionen als Zellulosebakterien vorhanden gewesen sein, vielleicht aber auch noch andere zellulosezersetzende Spaltpilze. Auch ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß neben Azotobakter andere Stickstoffbinder vorhanden waren, so z. B. Bacillus amylobacter, der ja, obgleich er anaerob ist, im durchlüfteten Boden in Symbiose mit Bakterien, die ihn vor Sauerstoff schützen, tätig ist.

1. Erdkulturversuche.

Diese Versuche wurden nach der Versuchsanordnung von A. Koch durchgeführt:

Um eine möglichst große Oberfläche, d. h. ungehinderten Luftzutritt, zu erhalten, wurden 1000 ccm Erlenmeyerkolben mit je 100 g gesiebter, lufttrockener Erde beschickt.

Kolben 1 erhielt 100 g Erde.
„ 2 „ 100 g „ , dazu 5% Zellulose in Form von Zelluloseflocken.
„ 3 „ 100 g „ , „ 5% Glukose.
„ 4 „ 100 g „ , „ 1% Glukose.

4 weitere Kolben wurden in gleicher Weise hergerichtet, jedoch mit sehr sandiger Erde versehen. Dann wurden nach gründlicher Durchfeuchtung der Erde sämtliche Kolben kräftig mit Azotobakter und Cytophaga beimpft, indem ein stark zersetztes Stück Filtrierpapier in jeden Kolben gegeben und 1 ccm einer Azotobakter-Aufschwemmung hinzugefügt wurde. Die Kolben wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt; für ständige genügende Durchfeuchtung wurde Sorge getragen. Die Stickstoffbestimmung wurde nach 6 Monaten vorgenommen.

Die Zellulose war sehr stark angegriffen, kleine Zelluloseflocken waren vollkommen in schleimige Massen übergegangen. Die mikroskopische Untersuchung solcher Zellulosestücke ergab stark von Bakterien zersetzte Zellulosefasern. Da in diesem Falle die zur Bestimmung der noch übriggebliebenen Zellulose gebräuchlichen Methoden (siehe S. 8) nicht anwendbar waren,

mußte von einer Bestimmung der verbrauchten Zellulose Abstand genommen werden. Die ermittelten Stickstoffwerte sind in Tab. 12 aufgeführt.

Tab. 12. mg Stickstoff pro 100 g trockene Erde nach 6 Monaten.

Ansätze	100 g Erde	100 g Erde + 5% Glukose (Vors. II 1% Glukose)	100 g Erde + 5% Zellulose + 0,5% Glukose	100 g Erde + 5% Zellulose + 1% Glukose
Versuch I	98,7	118,9	127,4	128,1
N-Zunahme	—	20,2	28,7	29,4
N-Zunahme nach Abzug des auf Glukose fallenden Teils . .	—	—	26,68	25,36
Versuch II	92,2	93,7	123,8	122,7
N-Zunahme	—	1,5	31,6	20,5
N-Zunahme nach Abzug des auf Glukose fallenden Teils . .	—	—	30,85	19,0

Bei Betrachtung der Stickstoffwerte fällt sofort der hohe Stickstoffgewinn der mit Zellulose versetzten Kulturen auf, während in den mit Glukose versetzten Kulturen entgegen unserer Erwartung ein nur verhältnismäßig geringer Stickstoffgewinn festgestellt werden konnte. Das ist vielleicht durch die Annahme zu erklären, daß sich auch andere Bakterien dieser guten Kohlenstoffquelle bedient haben und sie dadurch dem Azotobakter verlorenging. Dagegen ist der Stickstoffgewinn bei Zellulose-Zusatz eindeutig, so daß die Vermutung, daß in solchen Rohkulturen unter Ausnutzung der Zellulose ein Stickstoffgewinn stattfindet, als zutreffend angesehen werden darf, wenn auch die ermittelten Stickstoffwerte nicht unbeträchtlich voneinander abweichen. Ähnliche Werte hat A. Koch (1910) ermittelt. Wieviel Stickstoff auf die Zelluloseeinheit gebunden worden ist, konnte aus den oben erwähnten Gründen leider nicht ermittelt werden. Es sei jedoch in diesem Zusammenhang nochmals auf die Versuche von Hutchinson und Clayton (1919) hingewiesen, die bei Verwendung von Rohkulturen von „Spirochaeta cytophaga" und Azotobakter ebenfalls Stickstoffgewinn feststellen konnten und zwar einen solchen von 19,3 mg auf 1 g verbrauchte Zellulose, während bei Verwendung von 1 g Mannit als Kohlenstoffquelle der Stickstoffgewinn sich auf 3,15 mg belief.

2. Nährlösungsversuche.

Diese Versuche wurden wie die oben behandelten Reinkulturversuche durchgeführt mit dem einen Unterschied, daß, ganz wie bei den Erdversuchen, die Beimpfung zwar mit Azotobakter-Reinkulturen, aber mit Rohkulturen von Zellulosezersetzern vorgenommen wurde. Auch in diesen dürften neben Cytophagen ganz besonders Cellvibrionen vorhanden gewesen sein. Außerdem wurden Kontrollkolben mit Azotobakter allein beimpft.

Nachdem die sterilisierten 100 ccm-Erlenmeyerkolben, die 25 ccm Nährlösung B, 2% Zellulose und außerdem, um den Prozeß der Zelluloselösung und der Stickstoffbindung anzuregen, 0,02% $NaNO_3$ und 0,1% Glukose enthielten, beimpft worden waren, wurden sie teilweise bei 28° C, teilweise bei Zimmertemperatur aufgehoben. Nach einer Versuchsdauer von 35 bzw. 42 Tagen wurde zur Analyse geschritten. Eine andere hierher gehörige Versuchsreihe wurde nach 62 Tagen untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tab. 13 wiedergegeben.

Tabelle 13.

Versuchsreihe	Versuchsdauer in Tagen	Zusatz zur Nährlösung B	Beimpfung	Stickstoffgehalt. mg/100 ccm				
					Mittelwert	Nach Abzug der Kontrolle	Nach Abzug von 0,14 mg N (vgl. S. 11)	Nach Abzug des Nitratstickstoffs
I	35	Zellulose 2%	Azotobakter	2,08 1,96 1,98	2,00	1,38	-	
		Glukose 0,1% $NaNO_3$ 0,02%	Cytophaga + Azotobakter	6,30 7,28 5,18	6,25	5,63	6,11	2,81
			unbeimpfte Kontrolle	0,62	0,62	—	—	—
II	42	wie in Versuchsreihe I	Azotobakter	1,96 1,78 1,84	1,86	1,12	—	—
			Cytophaga + Azotobakter	5,19 5,28 4,94	5,14	4,4	5,0	1,7
			unbeimpfte Kontrolle	0,74	0,74	—	—	—
III	62	wie in Versuchsreihe I	Azotobakter	2,18 2,40 1,96	2,18	1,36	—	—
			Cytophaga + Azotobakter	7,40 7,14 7,82	7,45	6,63	7,31	4,01
			unbeimpfte Kontrolle	0,82	0,82	—	—	-

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, hatten die mit Azotobakter und mit Rohkulturen von Zellulosezersetzern beimpften Kulturen einen bemerkenswerten Stickstoffgewinn — auch bei Berücksichtigung des zugeführten Nitrates — im Vergleich mit den nur mit Azotobakter beimpften Kulturen zu verzeichnen. Daraus geht hervor, daß Azotobakter die beim Abbau der Zellulose durch Cytophagen und andere Zellulosebakterien entstehenden Produkte nur indirekt als Energiequelle verwerten kann, d. h. nur dann, wenn andere Bodenorganismen die primären Abbauprodukte weiter in eine für Azotobakter assimilierbare Form überführen.

Um nun in die zweifellos äußerst komplizierten Stoffwechselvorgänge in solchen Rohkulturen einen wenigstens etwas klareren Einblick zu verschaffen, knüpfe ich an die Beobachtungen an, über die ich bereits oben (S. 9) berichtet habe: daß nämlich in Rohkulturen sich nicht selten reduzierende Substanzen — manchmal auch ohne Toluolzusatz[1]) — als Derivate des Zelluloseabbaues nachweisen lassen, was für die Reinkulturgemische von Cytophaga und Azotobakter nicht gilt. Im allgemeinen genügt es, eine kleine Menge der angegriffenen Zellulose aus den Rohkulturen mit Kupfer-

[1]) Tetrault (1930) konnte ebenfalls ohne jeden Zusatz von Antisepticisa bei „Clostridium thermocellum" reduzierende Stoffe feststellen.

tartrat, gelöst in NaOH (nach Flückyger in Molisch, 1921), zu behandeln, um Reduktion zu erhalten. Wenn der Versuch auch hier und da mißlingt, so ist das verständlich, weil eben unkontrollierbare Bakteriengemische vorliegen. Man darf aber vermuten, daß die durch den Zelluloseabbau entstandenen Produkte in solchen Rohkulturen von den „Begleitbakterien" zu reduzierenden Substanzen umgewandelt werden, welche dann den Stickstoffbindern zugänglich sind. „Begleitbakterien" in diesem Sinne sind Bakterien, die sich nicht unmittelbar am Zelluloseabbau oder an der Stickstoffbindung beteiligen; sie bestanden meist aus Stäbchen und einem Organismus, der Ähnlichkeit mit einem Mykobakterium und auch mit Mycococcus cytophagus (Bokor, 1930) hatte. Ob die von solchen Bakterien gebildeten Stoffe Zellobiose, Glukose oder andere reduzierende Substanzen sind, wurde nicht ermittelt.

Von Wichtigkeit war es, zu wissen, ob die Zellobiose, die Pringsheim (1912) als erstes Abbauprodukt bei der Zellulosezersetzung durch thermophile Bakterien — er verwendete allerdings keine Reinkulturen von thermophilen Zellulosebakterien — von Azotobakter verwendet werden kann. In der Literatur finden sich zwei einander widersprechende Angaben über diesen Punkt: Während Koch und Seydel (1911) auf zellobiosehaltigen Nährböden kein Azotobakter-Wachstum erhalten konnten, teilt Rippel in seinen Vorlesungen über Bodenmikrobiologie (1933, S. 41) mit, daß Azotobakter Zellobiose verwerten kann. In eigenen Versuchen wurde Zellobiose benutzt, die von Fränkel & Landau, Berlin-Oberschöneweide, bezogen war. Es wurden sowohl Zellobiose-Nährагarröhrchen als auch die Lösungen A und B mit Zusatz von 1% Zellobiose verwandt. Die Röhrchen wurden im Dampftopf an zwei aufeinanderfolgenden Tagen sterilisiert. Die Kulturen wurden bei 28° C gehalten. Während auf den gleichen, mit Glukose versetzten Nährböden immer kräftiges Wachstum von Azotobakter einsetzte, war auf den zellobiosehaltigen Nährböden selbst nach mehreren Wochen und bei allen Wiederholungen solcher Versuche kein Wachstum festzustellen. Hierdurch erfährt der Befund von Koch und Seydel eine Bestätigung. Dagegen konnte ich in Zellobiose-Nährlösungen, welche mit Azotobakter-Rohkulturen beimpft wurden, Wachstum erzielen. Die mikroskopische Untersuchung ergab neben anderen Bakterien (sporenbildenden Stäbchen, Kokken usw.) eine größere Zahl von Azotobakter-Zellen. Koch und Seydel schließen aus ihren gleichsinnigen Befunden, daß Azotobakter die Zellobiose nicht unmittelbar als Energiequelle „für Vermehrung und Stickstoffbindung verwendet, wohl aber, wenn sie erst durch andere Bodenbakterien vorbereitend umgewandelt, wahrscheinlich hydrolysiert ist" (l. c., S. 567). Daß Zellobiose von Azotobakter erst nach Umwandlung ihres Moleküls verwertbar ist, geht auch aus Beobachtungen hervor, die ich mit Zellobiose-Nährböden machte, welche im Autoklaven bei alkalischer Reaktion ($p_H = 8$) sterilisiert worden waren, wobei die Lösung eine bräunliche Färbung angenommen hatte. Daß mit der Zellobiose eine Änderung vor sich gegangen war, bewies das, wenn auch nicht starke, so doch deutliche Azotobakter-Wachstum in diesen Lösungen.

Diese eben besprochene, von Koch und Seydel stammende, von mir übernommene Deutung hat zweifellos etwas für sich. Doch ist zu betonen, daß auch eine andere Erklärung unserer Ergebnisse möglich ist. Vielleicht handelt es sich gar nicht darum, daß in den Rohkulturen „Begleitbakterien" die durch Cytophaga gebildeten Abbauprodukte der Zellulose in reduzierende Substanzen verwandeln, die dann von Azotobakter ausgenutzt werden können. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß sich in unseren Rohkulturen andere Zellulosebakterien als Cytophaga, seien es Cellvibrionen, seien es noch andere, entwickelt haben, die selbst aus Zellulose reduzierende, den Stickstoffbindern zugängliche Kohlenstoffverbindungen bilden.

Welche von diesen beiden Deutungen zutrifft, wird z. Z. nicht zu entscheiden sein. Jedenfalls aber ergeben sich hieraus Anregungen für weitere Arbeit auf diesem Gebiete. Es wird sich entweder darum handeln, statt des unbekannten Gemisches von „Begleitbakterien" ganz bestimmte Formen, die selbst weder die Zellulose angreifen, noch den Stickstoff binden, zu den

Reinkulturgemischen von Cytophaga und Azotobakter hinzuzufügen und zu untersuchen, ob dann Stickstoffgewinne auf Kosten der Zellulose eintreten. Oder aber, man wird andere Zellulosezersetzer mit Azotobakter oder mit anderen Stickstoffbindern in Reinkultur kombinieren und untersuchen, ob es trotz der negativen Befunde mit Cytophaga und Azotobakter doch möglich sein wird, Stickstoffgewinne in zellulosehaltigen Kulturen zu erzielen, in denen nur ein Zellulosezerstörer und ein Stickstoffbinder miteinander tätig sind.

Zusammenfassung.

Es sollte versucht werden, ob in Nährmedien für Bakterien, welche frei sind von Stickstoffverbindungen und welche Zellulose als einzige Kohlenstoffquelle führen, nach gleichzeitiger Beimpfung mit einem zelluloselösenden und einem stickstoffbindenden Bakterium, beide in Reinkultur gezüchtet, Stickstoffbindung auf Kosten der Zellulose erfolgen kann.

Um einen zellulosezersetzenden Spaltpilz zu erhalten, wurden Anreicherungskulturen gezüchtet, in welchen reichlich Cytophaga-Arten nachzuweisen waren. Mit Hilfe der „Tonplatten-Methode" gelang es, daraus Reinkulturen einer Cytophaga zu gewinnen, welche auf Grund ihrer Morphologie und Physiologie wenn nicht identisch, so doch ganz nahe verwandt mit Cytophaga globulosa (Stapp und Bortels, 1935) ist. Sie bildet Mikrozysten und hat dieselben ernährungsphysiologischen Eigenheiten (strenge Spezialisierung auf Zellulose, Empfindlichkeit gegenüber bestimmten organischen Stoffen, wie Glukose oder Zellobiose usw.; Unfähigkeit, größere Dosen von Pepton zu ertragen; Bildung reduzierender Substanzen aus Zellulose nicht nachweisbar).

Als Stickstoffbinder, die mit dem Zellulosezersetzer kombiniert werden sollten, wurden Stämme von Azotobacter chroococcum, die in Reinkultur gezüchtet waren, gewählt.

In zellulosehaltigen Nährlösungen, die frei von anderen organischen Stoffen und von Stickstoffverbindungen waren und die mit Reinkulturen der beiden eben genannten Bakterien gleichzeitig beimpft waren, gelang es nicht, Zellulosezersetzung oder Stickstoffbindung nachzuweisen, auch dann nicht, wenn versucht wurde, durch Zugabe geringer Mengen von Nitrat und von Glukose Zelluloseabbau und Stickstoffbindung einzuleiten. Auch die Zugabe von stimulierenden Stoffgemischen (Progynon, Hefeextrakt) änderte nichts an diesem negativen Ergebnis. — Dagegen gelang es, mittels Rohkulturen von zellulosezersetzenden und stickstoffbindenden Bakterien, im Einklang mit vielen Angaben im Schrifttum, lebhaften Zelluloseabbau und auf dessen Kosten Stickstoffgewinn nachzuweisen. Solche Versuche gelangen sowohl bei Verwendung von Nährlösungen als auch in Erdbodenkulturen.

Da in solchen Rohkulturen reduzierende Substanzen als Folge des Zelluloseabbaus auftraten, was in Reinkulturen nicht der Fall war, ist vielleicht der Schluß erlaubt, daß in den Rohkulturen gewisse Begleitbakterien aus den durch die Zellulosezersetzer gebildeten Abbauprodukten reduzierende Stoffe bilden, welche dann von Azotobacter verwendet werden können. Falls das zutrifft, kann es sich aber nicht um Zellobiose handeln, da nach meinen Befunden, die mit den Angaben von Koch und Seydel übereinstimmen, Azotobakter die Zellobiose nicht verwerten kann.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle der Deutschen Forschungsgemeinschaft, mit deren Unterstützung die Arbeit durchgeführt wurde, meinen Dank auszusprechen. Herrn Prof. Dr. W. Benecke danke ich aufrichtig für seine zahlreichen Ratschläge und die stete Förderung meiner Arbeiten.

Literatur.

McBeth, J. G., Cellulose as a source of energy for nitrogen fixation. U. S. Departement of Agriculture Plant Industry. Circ. 131 (1913). p. 23. — Beijerinck, M. und van Delden, A., Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. 1902. S. 3—43.) — Bojanovsky, R., Zweckmäßige Neuerungen für die Herstellung eines Kieselsaure-Nährbodens und einige Beiträge zur Physiologie aerober Zelluloselöser. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 64. 1925. S. 222—233.) — Bokor, R., Mycococcus cytophagus n. sp. 1929 (Spirochaeta cytophaga Hutchinson und Clayton 1919), Untersuchungen über aerobe, bakterielle Zellulosezersetzung mit besonderer Berücksichtigung des Waldbodens. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 1—34.) — Bortels, H., Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 333—342.) — Bortels, H., Kurze Notiz über die Katalyse der biologischen Stickstoffbindung. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 87. 1933. S. 476—477.) — Bradley, L. A., and Rettger, L. F., Studies on aerobic bacteria commonly concerned in the decomposition of cellulose. (Journ. of Bact. Bd. 13. 1927. S. 321—345.) — Braun, H., Methoden zur Untersuchung des Verwendungsstoffwechsels pathogener Bakterien. Abderhalden, Hdb. d. biol. Arbeitsmethoden. Abt. XII. T. 2. H. 1. 1930. (Lief. 332.) — Cholodny, N., Über eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 620—652.) — Christensen, H. R., Ein Verfahren zur Bestimmung der zellulosezersetzenden Fähigkeit des Erdbodens. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27. 1910. S. 449—451.) — Dubos, R. J., Influence of the environmental conditions on the activities of cellulose decomposing organisms in the soil. (Ecology. Vol. 9. 1928. p. 12—27.) — Dubos, R. J., The decomposition of cellulose by aerobic bacteria. (Journ. of Bact. Vol. 15. 1928. p. 223—234.) — Engel, H., Beiträge zur Kenntnis des Stickstoffumsatzes grüner Pflanzen. (Planta. Bd. 7. 1929. S. 133—164.) — Flehmig, T., Untersuchungen über aerobe, bakterielle Cellulosezersetzung. Diss. Göttingen 1932. — Fitting, H., Untersuchungen über Chemodinese bei Vallisneria. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 67. 1929. S. 563.) — Goscher, v. N., Über zellulosezersetzende Bakterien. (Faserforschung. Bd. 2. 1922. S. 28—40.) — Heubült, J., Untersuchungen über Nitritbakterien. (Planta. Bd. 8. 1929. S. 398—422.) — Hutchinson, H. B., and Clayton, J., On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (Spirochaeta cytophaga n. sp.). (Journ. Agric. Sc. Vol. 9. 1919. p. 143—173.) — Issatschenko, B. und Wackenhut, A., Einige Beobachtungen über den Entwicklungszyklus eines die Zellulose zersetzenden Organismus. (Arch. Biol. Wissensch. Bd. 32. 1932. S. 484—490.) [Russ. m. dtsch. Zusfassg.] — Itersonjun., C. van, Die Zersetzung von Zellulose durch aerobe Mikroorganismen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. 1904. S. 689—698.) — Jander-Zakowski, Membranfilter, Cella- und Ultrafilter. Leipzig (Akad. Verlagsges.) 1929. — Keyssner, E. und Tauböck, K., Die Stickstoffbilanz. (Kleins Hdb. d. Pflanzenanalyse. Bd. IV/2. Wien 1933. S. 1345—1402.) — Kellermann, K. F., and McBeth, I. G., The fermentation of cellulose. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. S. 485—494.) — Kellermann, K. F., McBeth, I. G., Scales, F. M., and Smith, N. R., Identification and classification of cellulose-dissolving bacteria. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 39. 1913. S. 502—522.) — Koch, A., Über Luftstickstoffbindung im Boden mit Hilfe von Zellulose als Energiematerial. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27. 1910. S. 1—7.) — Koch, A. und Seydel, S., Über die Verwertung der Zellobiose als Energiequelle bei der Stickstoffbindung durch Azotobacter. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1911. S. 567—570.) — Koch, A. und Seydel, S., Versuche über den Verlauf der Stickstoffbindung durch Azotobacter. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1912. S. 570—577.) — Kroulik, A., Über thermophile Zellulosevergärer. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 36. 1913. S. 339—346.) — Krzemieniewska, H., Le cycle évolutiv de Spirochaeta cytophaga Hutchinson et Clayton. (Act. Soc. Bot. Poloniae. T. 7. 1930. p. 507—519.) — Krzemieniewska, H., Contribution à l'étude du genre Cytophaga (Winogradsky). (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 4. 1933. S. 394—408.) — Makrinoff, I. A., Vermehrung des Azotobacters und Stickstoffanhäufung bei Zersetzung pflanzlicher Überreste. (Arch. Scienc. Biol. T. 33. 1933. p. 367—379.) [Russisch.] Ref. im Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 281. — Makrinoff, I. A., Über die Zersetzung des Torfes unter aeroben Bedingungen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 89. 1933/34. S. 201—209.) — Makrinoff, I. A., Die biologische Bearbeitung von Pflanzenresten. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 154—157.) — Meyer, A., Practicum der botanischen Bakterienkunde. Jena 1903. — Molisch, H., Mikrochemie der Pflanzen. Jena 1923.

— Pringsheim, H., Über ein Stickstoff assimilierendes Clostridium. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. S. 795—800.) — Pringsheim, H., Über die Verwendbarkeit verschiedener Energiequellen zur Assimilation des Luftstickstoffes und die Verbreitung stickstoffbindender Bakterien auf der Erde. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908. S. 248—256.) — Pringsheim, H., Über die Verwendung von Zellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 300—304.) — Pringsheim, H., Weiteres über die Verwendung von Zellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. S. 222—227.) — Pringsheim, H., Über den fermentativen Abbau der Zellulose. (Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 78. 1912. S. 266—291.) — Pringsheim, H., Über die Vergarung der Zellulose durch thermophile Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 38. 1913. S. 513—516.) — Pringsheim, H., Der biologische Abbau der Zellulose. (Angew. Bot. Bd. 2. 1920. S. 217—221.) — Pringsheim, H. und Lichtenstein, S., Zur vermeintlichen Reinkultur der Zellulosebakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 60. 1924. S. 309—311.) — Rippel, A., Der biologische Abbau der pflanzlichen Zellmembranen. (Angew. Bot. Bd. 1. 1919. S. 78—97.) — Rippel, A., Garung. II. Zellulose. (Hdwb. d. Naturwiss. Bd. 4. 1934. S. 640—643.) — Rippel, A. und Flehmig, T., Untersuchungen über den aeroben Zellulosezersetzer Itersonia ferruginea. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 4. 1933. S. 229—236.) — Roberg, M., Beiträge zur Biologie von Azotobacter. I. Über die Frage der Filtrierbarkeit von Azotobacter. II. Der Stickstoffgehalt der Filtrate von Azotobacterkulturen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 82. 1935. S. 1—30, 65—98.) — Rokitzkaja, A. I., Biologische Phasen des im Erdboden Zellulose zersetzenden Mikroben Spirochaeta cytophaga und seine Verbreitung im Boden der Ukraine. (Pedology. Nr. 3. 1933. p. 209—224.) [Russisch.] Ref. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 91—92. — Sanborn, I. R., Physiological studies of cellulose fermentation. (Journ. Bact. Bd. 16. 1928. S. 315—319.) — Sanborn, I. R., and Hamilton, W. B., The influence of Azotobacter chroococcum upon physiological activities of cellulosedestroyers. Journ. Bact. Vol. 18. 1929. p. 169—173.) — Scales, F. M., A new method of precipitating cellulose for cellulose agar. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 44. 1916. S. 661—663.) — Schmidt, E. W., Torf als Energiequelle für stickstoffassimilierende Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 52. 1921. S. 281—289.) — Schöller, W. und Göbel, H., Die Wirkung des Follikelhormons auf Pflanzen. (Biochem. Ztschr. Bd. 251. 1932. S. 223—228.) — Schröder, M., Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 85. 1932. S. 177—212.) — Simola, P. E., Über den Abbau der Zellulose durch Mikroorganismen. (Annal. Acad. Scient. Fenn. Bd. 43. S. 89, 115.) — Skinner, C. E., The decomposition of cellulose by type strains of certain bacteria. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 78. 1929. S. 508—512.) — Skinner, C. E., An explication of the action of the so called accessory substances in the association of Azotobacter in cellulose decomposing organisms. (Journ. Bact. Vol. 19. 1930. p. 149—159.) — Snieszko, St., Beiträge zur Kenntnis der zellulosezersetzenden Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 78. 1929. S. 375—380.) — Snieszko, St., The isolation of a thermophilic cellulose fermenting organism. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 88. 1933. S. 403—409.) — Snieszko, St., and Kimball, N., Studies of the bacteria commonly found in association with the thermophilic cellulose-fermenting organism. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 88. 1933. S. 393—403.) — Stapp, C. und Bortels, H., Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstreu. I. Mitt. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 28—66.) — Tetrault, P. A., The fermentation of cellulose at high temperatures. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 81. 1930. S. 28—45.) — Tuorila, P., Zellulose als Energiequelle für freilebende stickstoffbindende Mikroorganismen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 75. 1928. S. 178—182.) — Waksman, S. A., and Skinner, C. E., Microorganisms concerned in the decomposition of cellulose in the soil. (Journ. of Bact. Vol. 12. 1926. p. 57—84.) — Waksman, S. A., and Carey, C., On the use of the silica gel plate for the isolation of cellulose-decomposing bacteria. (Journ. of Bact. Vol. 12. 1926. p. 87—95.) — Winogradsky, S., Etude sur la microbiologie du sol (Quatrième mémoire). Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. (Ann. Inst. Pasteur. T. 43. 1929. p. 549.) — Winogradsky, S., Sur la décomposition aerobie de la cellulose par les bactéries. Travaux récents. (Bull. Inst. Pasteur. T. 30. 1932. p. 369—379.)

Nachdruck verboten.

Die Größe des intrazellularen Druckes bei den geographischen Rassen von Bac. mycoides.

II. Mitteilung.

Von **E. N. Mischustin** und **W. A. Mirsojewa**, Moskau.

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Bestimmung des intrazellularen Druckes bei den einzelnen Rassen von Bac. mycoides.

Die vorliegende Arbeit bildet die Fortsetzung der früher veröffentlichten Untersuchung über die Größe des intrazellularen Druckes bei einigen Bodenbakterien. Unsere vorhergehende Untersuchung wurde hauptsächlich mit den geographischen Rassen von Bac. mycoides ausgeführt. Unsere Wahl fiel, wie wir bereits früher erwähnten, auf das genannte Bakterium aus dem Grunde, weil Bac. mycoides äußerst leicht erkannt und isoliert werden kann. In der vorliegenden Arbeit gehen wir nicht näher auf Fragen methodischen Charakters ein, da sie schon früher ausführlich genug erörtert worden sind. Zur Fortführung unserer Untersuchung wurden aus einer Reihe Ortschaften des europäischen Teiles der U.d.S.S.R. je 2—3 Rassen des Bac. mycoides genommen. Die von uns gewählten Ortschaften (geographischen Punkte) liegen in dem Gebiet zwischen 57 und 46° nördl. Breite und 30—53° östl. Länge.

In der Tab. 1 geben wir ein Verzeichnis der geographischen Punkte, von wo Bac. mycoides isoliert worden ist. Gleichzeitig mit der Angabe des Bezirks, wo der betreffende geographische Punkt gelegen ist, geben wir Daten über diejenigen klimatischen Verhältnisse, die bestimmend auf die Größe des intrazellularen Druckes bei Bac. mycoides einwirken konnten. Hierher gehört: 1. die Wärmemenge, die im Laufe der Zeit als die Lufttemperatur über 0° betrug, erhalten wurde; 2. die Wärmemenge während der Periode des Jahres, als die Lufttemperatur über 10° war und 3. die Niederschläge in Millimetern während der in den Punkten 1 und 2 angegebenen Zeit.

Uns bei unseren Untersuchungen auf die obenerwähnten Daten stützend, hielten wir es für richtig, uns auf die warme Jahreszeit zu beschränken, da bloß die letztere auf die eine oder andere Weise sich auf die physiologischen Besonderheiten der Mikroben auswirken kann.

Allerdings können die von uns der Untersuchung zugrunde gelegten Daten nicht als unbedingt tadellose und glücklich gewählte für die Korrelation mit den Daten des intrazellularen Druckes gelten, aber es bleibt uns nichts anderes übrig, als sie zu benutzen, da genauere Angaben, welche die Ausdörrung des Bodens bestimmter Gegenden charakterisieren, fehlen, und die letztere in der Hauptsache den bestimmenden Einfluß auf die Größe des intrazellularen Druckes bei den Bakterien hat.

Gewiß wäre es wünschenswert, in die Angaben über die Wärmemenge Korrekturen, die Feuchtigkeit des Klimas betreffend, einzuführen. Jedoch kann die Verwirklichung dieses an sich prinzipiell gewiß gerechtfertigten Wunsches die allgemeine Sachlage: Beziehung der Temperaturbedingungen

Nr.	Benennung der meteorologischen Stationen, von denen die klimatischen Daten entnommen sind		Ort der Probenentnahme
	Temperatur	Niederschläge	
1	Iwanowo-Wosnessensk	Iwanowo-Wosnessensk	Iwanowo-Wosnessensk
2	Menselinsk	Jolabuga	Menselinsk
3	Tambow	Kirssanow	Kirssanow
4	Kursk-Ssudscha (Mittel)	Kursk	Rylsk
5	Pawlowsk	Buturlin	Kalatsch
6	Kiew	Charkow	Popeljansk
7	Sinowjewsk	Dnepropetrowsk	Dolinskaja
8	Konstantinowka	Konstantinowka	Amwrossiisk (Donbaß)
9	Melitopol	Mariupol	Melitopol
10	Tichorezkaja	Tichorezkaja	Pawlowsk

der betreffenden Ortschaft zu dem intrazellularen Druck bei den Bakterien schwerlich bedeutend ändern, da die Unterschiede in der Befruchtung der von uns gewählten Bezirke mehr oder weniger vor der absoluten Größe der Werte des Temperaturfaktors in den Schatten treten müssen. Zudem fehlen meteorologische Daten (Angaben), welche die Dürre des betreffenden Klimas charakterisieren, fast völlig. Übrigens führen wir in unserer Arbeit nach dem Prinzip von Seljaninow berechnete bedingte Daten an, welche die Dürre des Klimas charakterisieren. Der erwähnte Autor bemerkt, daß die Summe der Temperaturwerte, durch 10 dividiert, ziemlich gut mit der Feuchtigkeitsmenge, die im Schatten an dem betreffenden Ort verdunstet, zusammenfällt. Das Verhältnis: Niederschläge : Verdunstung gibt einen Index für eine genügend große Versorgung mit Niederschlägen. Bei einem Index = 1 ist Niederschlagsmenge und Verdunstung von gleicher Größe. Bei einem Index geringer als 1 macht sich ein Mangel an Wasser bemerkbar, und zwar um so stärker, je kleiner der Index ist.

Seljaninow nimmt für seine der Periode der Entwicklung angepaßten Berechnungen nur die 3 Sommermonate (Juni, Juli, August), von dem Gedanken ausgehend, daß die klimatischen Verhältnisse dieser Periode die Ernte (den Ertrag) bestimmen. Für den Lebenszyklus der Bodenbakterien muß dieser „Index Seljaninows" natürlich anders berechnet werden, und zwar indem man die ganze Zeitperiode in Betracht zieht, in deren Verlaufe die Mikroben sich im Boden aktiv entwickeln und vermehren können. In Berücksichtigung dieses Umstandes nahmen wir bei der Berechnung des betreffenden Index für jede Ortschaft Daten bezüglich der Zeitperiode, wenn die Temperatur über + 10° war. Für 8 Orte fiel das mit der Periode vom Mai bis September (einschließlich) zusammen und für Melitopol und Pawlowsk bis Oktober (einschließlich). Auf diese Weise erhielten wir den von uns sog. „Dürre- (Trockenheits-) Index", dessen Bedingtheit bei der Berechnung ebenfalls augenscheinlich war. (Tabelle.)

Das faktische Material gemäß den Ergebnissen der Arbeit des laufenden Jahres ist in den folgenden Tabellen niedergelegt. Ausgehend von dem Bestreben, die Tabellen möglichst gedrängt zu gestalten, führen wir in ihnen nicht die parallelen Bestimmungen, die übrigens äußerst übereinstimmend waren, an.

In der Rubrik, die benannt ist „Veränderung des Umfanges der bakteriellen Säule beim wiederholten (zweimaligen) Zentrifugieren (in Salzlösung) in Prozenten im Verhältnis zum erstmaligen Zentrifugieren (in Bouillon)" und deren Sinn klar ist,

Länge	Breite	Summe der Temperaturen für die Zeitperiode mit Temperaturen		Menge der Niederschläge in mm in der Zeitperiode mit Temperaturen		Dürre-Index
°	°	über 0°	über 10°	über 0°	über 10°	
41	57	2123	2219	397	308	1,3
53	56	2395	2246	301	215	1,1
43	53	2805	2503	311	244	1,0
35	51,5	2824	2480	375	291	1,2
41	50,5	3144	2732	319	249	0,9
30	50	2990	2539	390	274	1,1
33	48	3259	2711	401	246	0,9
38,5	48	3660	3081	326	226	0,7
35	47	3795	3375	344	245	0,7
40	46	3768	3322	394	266	0,8

werden nicht selten 2—3 Zahlen angeführt. Sie beziehen sich auf verschiedene Rassen von Bac. myc. am betreffenden Orte. Von den auf diese Weise gewonnenen Werten nehmen wir den Mittelwert.

In einer besonderen Rubrik wird „die Veränderung des Umfanges der bakteriellen Saule im Verhaltnis zur Kontrollbestimmung (dem zweiten Zentrifugieren in Bouillon)" angegeben.

Bei der Betrachtung und Beurteilung der Angaben nehmen wir die Lösung als schwach hypertonisch an, wenn die Volumverminderung der Zelle sich dem Verhältnis 10% in bezug auf die Kontrollbestimmung nähert. Eine geringere Volumverminderung mit Sicherheit bei Anwendung der von uns gebrauchten Methode festzustellen, ist schwierig, worauf wir bereits in unserer vorhergehenden Arbeit hingewiesen haben.

Es ist von Interesse, zu bemerken, daß wir fast in allen Fällen beim Übergang zu stärkeren hypertonischen Lösungen nach dem von uns festgestellten Prinzip einen mehr oder weniger schroffen Sprung in bezug auf die Verstärkung der Volumverminderung der Zellen beobachten, was ebenfalls die Richtigkeit der von uns gemachten Schlußfolgerung bestätigt.

Die weiter unten angeführten Daten ordnen wir nach Ortschaften gemäß der aufsteigenden Konzentration der hypertonischen Lösungen zwecks Erforschung der Rassen von Bac. mycoides.

I. Bezirk Iwanowo-Wosnessensk (57° nördl. Br. und 41° östl. Länge).

Wie aus den oben angeführten Daten der Tab. 1 hervorgeht, kann als schwach hypertonische Lösung für die Rassen von Bac. mycoides im Bezirk Iwanowo-Wosnessensk eine 0,05 mol NaCl-Lösung angesehen werden, in welcher die Volumverminderung im Durchschnitt ungefähr 7% im Verhältnis zur Kontrolle erreicht. In unseren Versuchen ist das der kleinste

Tab. 1. Bezirk Iwanowo-Wosnessensk (57° n. Br. und 41° östl. Länge).

Nr.	Die zum Zentrifugieren genommene Salzkonzentration	Umfang der Säule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhältnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle (Zentrifugieren in Bouillon)	97,6	96,3	—	—	97,0
2	0,05 mol NaCl . . .	87,5	92,5	—	—	89,0
3	0,1 mol NaCl . . .	82,9	88,9	—	—	85,9
4	0,15 mol NaCl . . .	82,6	70,8	—	—	76,7
5	0,2 mol NaCl . . .	81,8	—	—	—	81,8

von den erhaltenen Werten der hypertonischen Lösung. Wenn wir die klimatischen Verhältnisse des Bezirks Iwanowo-Wosnessensk mit denen der anderen Bezirke vergleichen, so können wir es als Bezirk mit der geringsten Wärmemenge und der größten Feuchtigkeit charakterisieren. Hieraus erhellt, daß die Größe des intrazellularen Druckes hier sehr klein sein muß, was wir in der Tat feststellen.

II. Bezirk Menselinsk (56° nördl. Br. und 53° östl. Länge).

Die Rassen von Bac. mycoides im Bezirk Menselinsk beginnen, wie aus der Tab. 2 ersichtlich ist, bei der NaCl-Kontraktion von ungefähr 0,1 mol, den Umfang der Bakterienzelle merklich zu verringern. Daher rechnen wir diese Lösung im gegebenen Falle als schwach hypertonisch. Der Bezirk Menselinsk steht in bezug auf die im Laufe der heißen Jahreszeit erhaltene Wärmemenge dem Bezirk Iwanowo-Wosnessensk sehr nahe, aber die Menge der Niederschläge ist hier bedeutend geringer. Das äußert sich allem Anscheine nach auch in der Erhöhung des intrazellularen Druckes bei der Rasse von Bac. mycoides, die sich in diesem Bezirk befindet.

Tab. 2. Bezirk Menselinsk (56° nördl. Breite und 53° östl. Länge).

Nr.	NaCl-Konzentration	Umfang der Säule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhältnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	90,0	93,7	95,0	99,1	94,4
2	0,05 mol NaCl . . .	—	—	—	94,6	94,6
3	0,1 mol NaCl . . .	83,7	83,3	98,5	93,9	87,6
4	0,15 mol NaCl . . .	82,0	83,3	—	94,8	86,6
5	0,2 mol NaCl . . .	73,0	77,8	85,0	—	78,6

III. Bezirk Kalatsch (50,5° nördl. Br. und 41° östl. Länge).

Die Rasse von Bac. mycoides des genannten Punktes beginnt eine mehr oder weniger stark ausgesprochene Verringerung des Umfanges der Bakterienzelle beim Zentrifugieren in einer NaCl-Konzentration von 0,15 bis 0,20 mol zu zeigen.

Tab. 3. Bezirk Kalatsch (50,5° nördl. Breite und 41° östl. Länge).

Nr.	NaCl-Konzentration	Umfang der Säule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhältnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	97,4	15,8	94,4	—	95,9
2	0,1 mol NaCl . . .	96,3	91,7	91,7	—	93,2
3	0,15 mol NaCl . . .	95,6	90,2	86,6	—	90,8
4	0,2 mol NaCl . . .	90,9	89,8	87,2	—	89,3
5	0,25 mol NaCl . . .	87,0	86,0	—	—	86,5
6	0,3 mol NaCl . . .	86,1	85,8	—	—	86,0

Wie aus der Tab. 3 zu ersehen, ist die Sonnenstrahlung in Kalatsch bedeutend stärker als im vorhergehenden Punkte, bei fast gleicher Feuchtigkeit. Das macht das Klima bedeutend trockener, was sich in der Größe des intrazellularen Druckes der Bakterienzellen äußert.

IV. Bezirk Popeljansk (50° nördl. Br. und 30° östl. Länge).

Popeljansk hat fast dieselben klimatischen Daten, wie Kalatsch. Hier steigt jedoch die Größe des intrazellularen Druckes bei Bac. mycoides merklich. So wird eine mehr oder weniger bedeutende Verringerung des Zellumfanges im vorliegenden Falle bloß bei einer Konzentration von etwa 0,25 mol NaCl-Lösung beobachtet. Ein derartiges Bild tritt bei allen drei zur Untersuchung benutzten Rassen von Bac. mycoides in Erscheinung, was die Möglichkeit eines Fehlers ausschließt. Die hier beobachtete Größe des intrazellularen Druckes bei Bac. mycoides im Bezirk von Popeljansk, die etwas höher ist als angenommen werden konnte, läßt sich vielleicht durch einige von uns nicht in Betracht gezogene, mit dem hiesigen Klima zusammenhängende Faktoren erklären.

Tab. 4. Bezirk Popeljansk (50° nördl. Breite und 30° östl. Länge).

Nr.	NaCl-Konzentration	Volumen der Säule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhältnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	97,5	100	97,5	—	98,3
2	0,2 mol NaCl	100	98,9	97,4	—	98,8
3	0,25 mol NaCl	—	93,2	90,6	—	91,9
4	0,3 mol NaCl	89,1	94,1	91,0	—	91,4
5	0,4 mol NaCl	88,9	94,0	—	—	91,5

V. Bezirk Rylsk (51,5° nördl. Br. und 35° östl. Länge).

In dem Bezirk Rylsk, der etwas kälter und feuchter ist als der vorhergehende, sinkt die Größe des intrazellularen Druckes bei den Rassen von Bac. mycoides. Wir halten im vorliegenden Falle eine 0,15 mol NaCl-Lösung für schwach hypertonisch, da hier eine mit völliger Sicherheit bemerkbare Verringerung des Umfanges der Zellenmasse (des Zelleibes) vorhanden ist. Bei der Untersuchung des aus Rylsk stammenden Bac. mycoides wurden, wie aus Tab. 5 zu ersehen ist, 2 Rassen des erwähnten Bakteriums genommen.

Tab. 5. Bezirk Rylsk (51,5° nördl. Breite und 35° östl. Länge).

Nr.	NaCl-Konzentration	Volumen der Säule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhältnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	95,3	95,3	—	—	95,3
2	0,1 mol NaCl	94,0	91,1	—	—	92,6
3	0,15 mol NaCl	88,9	87,7	—	—	88,8
4	0,2 mol NaCl	83,8	83,7	—	—	83,5

VI. Bezirk Kirssanow (53° nördl. Br. und 43° östl. Länge).

Im Abschnitt VI wird das Material für 2 Rassen von Bac. mycoides des Bezirks Kirssanow gegeben, der etwas trockener ist als der vorhergehende. Hier wird mit völliger Bestimmtheit eine Verringerung des Zellumfanges der Bakterien bei einer Konzentration von ungefähr 0,2 mol NaCl-Lösung festgestellt.

Bei schwächeren NaCl-Konzentrationen überschreitet die beobachtete Verringerung des Zellumfanges nicht die Fehlergrenze der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode.

Tab. 6. Bezirk Kirssanow (53° nordl. Breite und 43° ostl. Lange).

Nr.	NaCl-Konzentration	Volumen der Saule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhaltnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	100	90,7	—	—	95,4
2	0,05 mol NaCl . . .	100	—	—	—	100
3	0,1 mol NaCl . . .	95,9	85,0	—	—	90,5
4	0,15 mol NaCl . . .	95,3	87,7	—	—	91,5
5	0,2 mol NaCl . . .	93,0	83,0	—	—	87,5

VII. Das Donez-Gebiet (48° nördl. Br. und 38,5° östl. Länge).

Das äußerst trockene Klima des Donez-Gebietes prägt sich auch in der Größe des intrazellularen Durckes bei den diesem Gebiet eigentümlichen Rassen von Bac. mycoides aus. Hier halten wir für eine schwach hypertonische Lösung eine 0,25 mol. NaCl-Konzentration (siehe Tab. 7). Eine schwächere NaCl-Konzentration von 0,2 mol, die z. B. bei den aus dem Bezirk Iwanowo-Wosnessensk stammenden Rassen von Bac. mycoides eine Verringerung des Zellumfanges um 16% ergibt, ruft hier eine äußerst schwache Verminderung der bakteriellen Säule hervor.

Tab. 7. Das Donez-Gebiet (48° nördl. Breite und 38,5° östl. Lange).

Nr.	NaCl-Konzentration	Volumen der Saule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhaltnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	98,5	96,9	—	—	97,7
2	0,2 mol NaCl . . .	95,6	94,3	—	—	94,9
3	0,25 mol NaCl . . .	92,4	88,9	—	—	90,5
4	0,3 mol NaCl . . .	91,2	88,4	—	—	89,8
5	0,4 mol NaCl . . .	—	87,9	—	—	87,9

VIII. Bezirk der Station Dolinskaja (48° nördl. Br. und 33° östl. Länge).

Der etwas feuchtere Bezirk der Station Dolinskaja ändert jedoch nicht wesentlich die Größe des intrazellularen Druckes im Vergleich mit dem vorher genannten Bezirk.

Tab. 8. Bezirk der Station Dolinskaja (48° n. Br. und 33° östl. Lange).

Nr.	NaCl-Konzentration	Volumen der Säule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhältnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	95,0	95,4	92,3	—	94,2
2	0,2 mol NaCl . . .	91,0	95,1	87,5	—	91,2
3	0,25 mol NaCl . . .	—	—	78,6	—	78,6
4	0,3 mol NaCl . . .	87,6	85,5	78,5	—	83,9

Allerdings finden wir hier die Andeutung einer gewissen Verringerung der erwähnten Größe. In den 0,25 und 0,3 mol NaCl-Lösungen beobachten

wir eine größere Verringerung des Zellumfanges, als bei den Rassen des Donez-Gebietes, der beobachtete Unterschied läßt sich jedoch infolge der Unvollkommenheit der Bestimmungsmethode nicht in ziffernmäßiger Form ausdrücken.

IX. Bezirk Melitopel (47° nördl. Br. und 35° östl. Länge).

Im Abschnitt IX sind die ziffernmäßigen Ergebnisse der Analyse angegeben, die sich auf die Rassen im Bezirk Melitopel beziehen. Das Klima des Bezirks Melitopel, das äußerst trocken ist, erhöht die Größe des intrazellularen Druckes bei Bac. mycoides. Hier kann eine deutlich bemerkbare Verringerung des Umfanges der Bakterienmasse bloß bei einer 0,3 mol NaCl-Konzentration beobachtet werden. Diese Konzentration betrachten wir als schwach hypertonische Lösung für die melitopelschen Rassen von Bac. mycoides.

Tab. 9. Bezirk Melitopel (47° nördl. Breite und 35° ostl. Länge).

Nr.	NaCl-Konzentration	Volumen der Saule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhaltnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	96,1	—	—	—	—
2	0,2 mol NaCl . . .	96,0	—	—	—	—
3	0,25 mol NaCl . . .	92,1	—	—	—	—
4	0,3 mol NaCl . . .	87,5	—	—	—	—
5	0,35 mol NaCl . . .	64,7	—	—	—	—

X. Bezirk Pawlowsk (46° nördl. Br. und 40° östl. Länge).

Der Bezirk Pawlowsk im nördlichen Kaukasus kann als etwas feuchter angesehen werden als die Bezirke des Donezbeckens und von Melitopel. Jedoch übersteigt der intrazelluläre Druck bei den Rassen des oben genannten Bezirks den bei den Bakterien des Melitopelschen Gebietes beobachteten. Die hypertonische NaCl-Lösung liegt hier über 0,3 mol NaCl (zwischen 0,3 und 0,4 mol). Diese Abweichung kann nicht als zufällig angesehen werden, da die vorhergehende Arbeit ebenfalls Angaben über das Vorhandensein eines hohen intrazellularen Druckes der aus dem nördlichen Kaukasus stammenden Rasse von Bac. mycoides brachte. Dieses interessante Moment in nähere Beziehung zu klimatischen Faktoren zu bringen, ist uns jedoch bisher nicht gelungen.

Tab. 10. Bezirk Pawlowsk (46° nordl. Breite und 40° östl. Länge).

Nr.	NaCl-Konzentration	Volumen der Saule der Bakterienzellen beim 2. Zentrifugieren in Proz. im Verhaltnis zum 1. Zentrifugieren				
		I. Rasse	II. Rasse	III. Rasse	IV. Rasse	Mittel
1	Kontrolle	98,9	93,3	98,4	—	96,9
2	0,1 mol NaCl . . .	97,7	93,3	—	—	95,5
3	0,2 mol NaCl . . .	95,5	100,0	96,6	—	97,4
4	0,3 mol NaCl . . .	93,3	96,7	95,4	—	95,1
5	0,4 mol NaCl . . .	81,8	82,1	87,4	—	83,8

Beziehungen zwischen der Größe des intrazellularen Druckes bei Bac. mycoides und den klimatischen Faktoren.

In den dieser Arbeit beigefügten Abb. 1 und 2 wird eine graphische Darstellung der Abhängigkeit der Größe des intrazellularen Druckes

bei Bac. mycoides von den klimatischen Faktoren gegeben. So werden in Abb. 1 die Angaben über diese Größe den Angaben über die Wärmemenge gegenübergestellt, die im Laufe der Zeitperiode erhalten wurde, wenn die Temperatur des betreffenden Ortes über 0° beträgt. Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist die allgemeine Gesetzmäßigkeit der dabei erhaltenen Kurve, ungeachtet einer gewissen Bedingtheit einer derartigen Gegenüberstellung, durchaus zufriedenstellend. Diese Kurve nähert sich ziemlich stark einer geraden Linie. Demnach wird der intrazellulare Druck durch dieselbe Gesetzmäßigkeit ausgedrückt, wie sie bezüglich der Temperaturverhältnisse des Klimas besteht (d. h. durch eine gleichbleibende Linie).

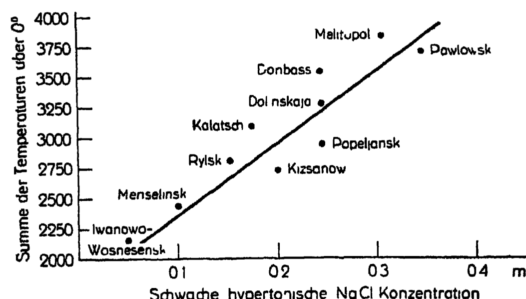


Abb 1.

Unter anderem haben wir in den Abb auch die in der vorhergehenden Arbeit erhaltenen Daten angegeben.

Eine weniger strenge Abhängigkeit erhält man, wenn man die Gegenüberstellung der Größe des intrazellularen Druckes mit der Größe der Wärmemenge vornimmt, die im Laufe der Zeitperiode erhalten wird, in der die Temperatur über 10° beträgt (s. Abb. 2).

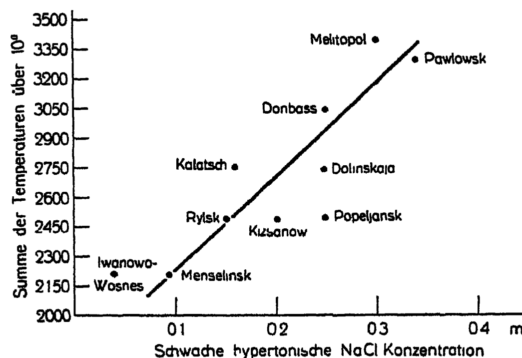


Abb. 2.

Es ist schließlich noch zu bemerken, daß der weiter oben angeführte „Trockenheitsindex (Trockenheitskoeffizient) eine Wechselbeziehung zum intrazellularen Druck bei Bac. mycoides aufweist, die einer geraden Linie nahekommt. Die Bedingtheit des betreffenden Index (Koeffizienten) führt hier zu einer größeren Anzahl schroffer Abweichungen.

Zusammenfassung.

1. Die Größe des intrazellularen Druckes bei den einzelnen Rassen von Bac. mycoides ändert sich in bedeutendem Maße im Zusammenhang mit den klimatischen Bedingungen des Fundortes dieses Bakteriums.

2. In der vorliegenden Arbeit sind die einer Reihe geographisch verschiedener Punkte der U. d. S. S. R. entstammenden Rassen von Bac. mycoides analysiert. Die dabei erhaltenen Daten über die Größe des intrazellularen Druckes bei Bac. mycoides stehen in ziemlich guter Korrelation zu denjenigen des Wärmehaushaltes der betreffenden Ortschaften und die entsprechende Abhängigkeit kann vergleichsweise graphisch durch eine gerade Linie ausgedrückt werden.

Nachdruck verboten

Untersuchungen über das Wachstum von Bakterien auf Fleisch, besonders im Bereich des Gefrierpunktes, und über die Bedeutung des Anfangskeimgehaltes.

[Aus dem Botanischen und dem Kältetechnischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.]

Ausgeführt mit Unterstützung des Reichskuratoriums für Technik in der Landwirtschaft.

Von **W. Schwartz** und **W. Bender**, V. D. I. [1])

Mit 7 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Die Untersuchungen von Schwartz und Schmid (1931) und Schwartz und Loeser (1935) sind in dem für die Kühllagerung von Fleisch üblichen Temperaturbereich zwischen $\pm 0^\circ$ C und $+ 6^\circ$ C bei Luftfeuchtigkeiten von $\varphi = 70\%$ bis $\varphi \simeq 100\%$ durchgeführt worden.

Die vorliegende Arbeit knüpft an diese Untersuchungen an und prüft das Verhalten der Bakterien im Bereich des Gefrierpunktes von Fleisch, der bei etwa — 0,9 bis — 1° C liegt. Dabei sollte vor allem der Einfluß des Gefriervorgangs auf das Bakterienwachstum durch Vergleich unterkühlter und gefrorener Proben bei gleicher Lagertemperatur erfaßt werden. Haines (1932) hat hierzu einige Beobachtungen veröffentlicht, die sich auf das Verhalten von Torula und von Sporotrichum carnis erstrecken. Stewarts (1934) Versuche an Fischfilets genügen noch nicht, da es nur bei vereinzelten Proben gelang, den unterkühlten Zustand für längere Zeit aufrechtzuerhalten.

Literaturangaben über die Bedeutung des Anfangskeimgehalts (Haines, 1932; Haines u. Smith, 1933) für die Haltbarkeit des Fleisches ließen es wünschenswert erscheinen, auch diesen Faktor einer experimentellen Bearbeitung unter möglichst genau festgelegten Bedingungen zu unterziehen.

Schließlich wurde im Anschluß an die von Kaeß und Schwartz (1935) bei Schimmelpilzen erzielten Resultate der Versuch gemacht, auch den Verlauf des Bakterienwachstums bei sehr hohen relativen Luftfeuchtigkeiten genau zu verfolgen.

II. Methode.

1. Einrichtung der beiden Kühlschränke[2]) und Anordnung der Versuche waren im wesentlichen die gleichen, wie bei Schwartz und Loeser (1935).

2. Die Keimzahlbestimmung erfolgte, wie in den früheren Arbeiten, nach entsprechender Verdünnung der Bakterienaufschwemmung mit Hilfe des Kochschen Plattenverfahrens. Es liegt im Wesen dieser Methode, daß die Streuungen verhältnismäßig hoch sind und nur bei sehr gleichmäßigem Arbeiten in erträglichen Grenzen bleiben. In einigen Vorversuchen wurden die verschiedenen Fehlerquellen nochmals kritisch geprüft.

---

[1]) Der eine von uns (Bender) wurde während der Durchführung der Arbeit vom deutschen Ingenieurdienst unterstützt.

[2]) Ate (Firma A. Teves) und Elektrolux.

Die Art und Weise der Verdunnung hatte geringen Einfluß auf das Ergebnis. Zwei Bakterien-Aufschwemmungen, von denen die eine aus der Stammlosung in einer einmaligen Verdunnung 1 : 1000, die andere in drei Verdunnungs-Stufen je 1 : 10 hergestellt worden war, ergaben bei der Zahlung fast dieselben Werte.

Stellte man von einer Bakterienaufschwemmung mit hohem Keimgehalt zehn verschiedene Verdunnungen her, so zeigte sich, daß die aus diesen Verdünnungen ermittelten Keimgehalte der Stammlosung hochstens um 10 bis 15% vom Mittelwert abwichen.

Parallele Plattenkulturen, die dieselbe Anzahl von Bakterienkolonien ergeben sollten, zeigten immer Streuungen. Der durch die Streuungen verursachte mittlere Fehler μ ist nach Putter (1929):

$\mu = \sqrt{\frac{\Sigma \Delta_x^2}{n-1}}$, wobei Δ_x die Differenz der einzelnen Zählungen vom Mittelwert und n die Zahl der Bestimmungen ist.

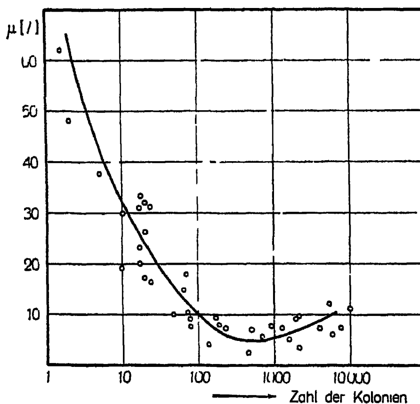


Abb. 1. Große des mittleren Fehlers in Abhangigkeit von der Zahl der Kolonien je Petrischale.

Nach zahlreichen Vorversuchen und nach der Auswertung der Hauptversuche, die stets mit 3 bis 4 Parallelplatten durchgefuhrt wurden, war der mittlere Fehler von der absoluten Zahl der Bakterienkolonien auf einer Platte abhangig; er war am kleinsten, wenn man die Verdunnung so wählte, daß 100 bis 1000 Kolonien je Petrischale zur Entwicklung kamen (Abb. 1).

3. Auf frischem Fleisch, das im Schlachtraum und im Laden während 2 bis 3 Std. ungeschutzt aufbewahrt worden ist, schwankt der Keimgehalt im allgemeinen zwischen 10^2 und 10^4 Keimen je Quadratzentimeter Oberfläche. Die Werte liegen im Winter mehr bei der unteren Grenze, im Sommer nähern sie sich der oberen Grenze, erreichen zuweilen sogar 10^5.

Durch kurzes Abflammen des ganzen Muskels vor der Präparation war es möglich, auf den einzelnen zylindrischen Versuchsstücken[1]) einen Anfangskeimgehalt von 10^2 bis 10^3 Keimen je Quadratzentimeter und dadurch annähernd gleiche Ausgangsverhältnisse fur die Entwicklung der Bakterien zu erzielen.

Ein Versuch, der mit sechs Fleischproben zur Bestimmung der Streuung im Anfangskeimgehalt durchgeführt wurde, und der die Verhältnisse so zeigt, wie sie meistens vorlagen, hat bei einem Mittelwert von 123 Keimen die Einzelwerte von 114, 203, 75, 87, 79 und 194 Keimen je Quadratzentimeter Oberfläche ergeben.

Die Streuungen blieben meistens innerhalb der in den Vorversuchen gefundenen Grenzen, jedoch konnte es vorkommen, daß die Keimzahl eines Stückes bis zu einer Zehnerpotenz vom Mittelwert abwich. Diese Schwan-

[1]) Das Verhaltnis von Oberflache zu Gewicht war bei unseren Versuchsstucken F/G = 0,14 m²/kg.

kungen im Anfangskeimgehalt sind wohl die hauptsächlichste Ursache der teilweise sehr großen Streuungen mancher Versuchswerte.

Der Anfangskeimgehalt einer jeden Versuchsserie wurde an drei Proben bestimmt. Bei sehr niedrigen Anfangswerten (10 Keime je Quadratzentimeter und weniger) wurden die späteren Streuungen so groß, daß sich die Fortsetzung des Versuches nicht lohnte.

4. Zur Durchführung von Versuchen mit verschiedenem Anfangskeimgehalt war es erforderlich, den Anfangskeimgehalt im Abstand von ungefähr je einer Zehnerpotenz zu staffeln, was sich durch Impfung der Fleischproben ermöglichen ließ.

Mit einem kleinen Zerstäuber wurde 1 ccm einer Bakterienaufschwemmung gegen die Fleischprobe gespritzt, die im Abstand von 50 cm vom Zerstäuber in gleicher Höhe an einem Gestell drehbar aufgehängt war. Bei dieser Versuchsanordnung gelangte ungefähr $^1/_{10}$ ccm auf das Fleischstück, was durch Wägung festgestellt werden konnte. Während des Aufspritzens, das 2 bis 3 Sek. dauerte, wurde die Probe dreimal gedreht, so daß eine sehr gleichmäßige Verteilung der Bakterien auf der Fleischoberfläche gewährleistet war. Den zur Erzielung eines bestimmten Anfangskeimgehalts erforderlichen Bakteriengehalt der Spritzflüssigkeit ermittelten wir durch Vorversuche, in denen bestimmte Bakterienmengen, gemessen in Platinösen, in einem bestimmten Flüssigkeitsvolumen verteilt wurden.

Durch Verdünnung der ersten Aufschwemmung im Verhältnis 1 : 10 konnten mit derselben Menge aufgespritzter Flüssigkeit bei den folgenden Versuchsreihen Anfangskeimgehalte erzielt werden, die jeweils um eine Zehnerpotenz niedriger waren.

Der ursprüngliche Bakteriengehalt war bei diesen Versuchen durch starkes Abflammen des Muskels vor dem Ausstanzen der Versuchszylinder so ermäßigt worden, daß er im Vergleich zu der Menge der aufgespritzten Keime nicht in Betracht kam.

In den zunächst durchgeführten Vorversuchen erwies sich die Methode der Impfung als brauchbar. Im folgenden sind einige Versuchswerte wiedergegeben:

a) Sechs Fleischproben, geimpft mit je etwa $^1/_{10}$ ccm einer Bakterienaufschwemmung:

Keimgehalte je cm² Oberfläche	8 570	12 420
,, ,, ,, ,, ...	11 290	15 370
,, ,, ,, ,, ...	13 330	11 700

b) Je zwei Fleischstücke, geimpft mit je etwa $^1/_{10}$ ccm verschiedener Bakterienaufschwemmungen, deren Keimgehalte um je eine Zehnerpotenz höher waren.

Aufschwemmung	A	90	Keime je cm² Oberfläche
,,	A	135	,, ,, ,, ,,
,,	B	860	,, ,, ,, ,,
,,	B	1 060	,, ,, ,, ,,
,,	C	12 400	,, ,, ,, ,,
,,	C	8 500	,, ,, ,, ,,
,,	D	131 000	,, ,, ,, ,,
,,	D	124 000	,, ,, ,, ,,

Die Reihenfolge der Impfung war stets so, daß die Fleischstücken mit dem höchsten Anfangskeimgehalt zuletzt gespritzt wurden.

5. Die Zusammensetzung der Bakterienflora konnte bei allen Versuchen als im wesentlichen gleichartig angesehen werden, da die „Infektion“ des Fleisches, abgesehen von der Luftinfektion im Laboratorium, stets aus demselben Schlacht- und Lagerraum stammte. Dieser Umstand ist wichtig, da in dem Temperaturbereich von ± 0 bis — 3° C manche der auf Kühlfleisch vorkommenden Bakterien bereits ihr Wachstum einstellten.

Nur bei den Versuchen mit verschiedenem Anfangskeimgehalt haben wir mit Reinkulturen eines von Fleisch isolierten Micrococcus-Stammes gearbeitet.

III. Versuchsergebnisse.

1. Einfluß des Anfangskeimgehalts.

In früheren Untersuchungen ist der Anfangskeimgehalt nur soweit beachtet worden, als es die Einhaltung gleichmäßiger Versuchsbedingungen erforderte. Es mußte daher noch aufgeklärt werden, wie sich Unterschiede im Anfangskeimgehalt auf die Lagerfähigkeit des Fleisches auswirken, d. h. ob sie sich rasch, langsam oder überhaupt nicht ausgleichen.

Wichtige Anhaltspunkte kann man aus den Untersuchungen von Haines und Smith (1933) entnehmen, wonach das Schmierigwerden des Fleisches, das ein Maßstab für die Genußuntauglichkeit ist und bei einem durch die Plattenkultur erfaßbaren Keimgehalt von etwa $10^{7,5}$ Bakterien je Quadratzentimeter Oberfläche eintritt, um so eher beginnt, je höher der Anfangskeimgehalt war. Unterschiede im Anfangskeimgehalt würden sich nach dieser Auffassung also mindestens so spät ausgleichen, daß der Höhe des Anfangskeimgehalts praktische Bedeutung zukommt.

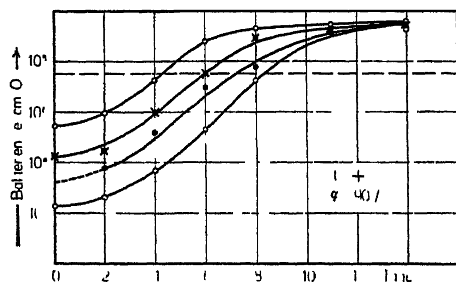


Abb. 2. Einfluß des Anfangskeimgehaltes auf das Bakterienwachstum (φ = 90%, t = + 3° C). Anfangskeimgehalte: 210, 1400[1]), 18200 und 284000 Keime je cm² Oberfläche.

Da sich aus den Versuchswerten von Haines und Smith noch kein klares Bild vom Verlauf der Wachstumskurven ergibt, haben wir unter Verwendung unserer Impfmethode den Einfluß verschiedener Anfangskeimgehalte genauer verfolgt.

Zwei Versuchsreihen bei φ = 90% und t = ± 0 und + 3° C zeigten übereinstimmend, daß sich Unterschiede im Anfangskeimgehalt von der hier vorliegenden Größenordnung in dem für die praktische Kaltlagerung wichtigen Bereich, d. h. solange sich das Fleisch in genießbarem Zustand befindet, nicht ausgleichen (Abb. 2). Die Wachstumskurven sind also in ihrem anfänglichen und mittleren Teil annähernd kongruent und vertikal zueinander verschoben. Erst im letzten Abschnitt tritt eine Annäherung an einen gemeinsamen Höchstwert ein, dessen Lage in erster Linie durch die hemmenden Wirkungen von lokalem Nährstoffmangel und von Stoffwechselprodukten bestimmt sein dürfte.

Bei einer Lagerung bei + 3° wird der Grenzwert von $10^{7,5}$ Keimen je Quadratzentimeter Oberfläche bei der obersten Kurve nach etwa 4 Tagen, bei

[1]) Dieser Wert mußte durch Extrapolieren nachträglich ermittelt werden, da die betreffende Fleischprobe infolge Infektion ausfiel.

der untersten erst nach 8 Tagen erreicht. Allgemein läßt sich die Lagerzeit unter Berücksichtigung der verschiedenen Versuchstemperaturen durch Herabsetzung des Anfangskeimgehalts von 10^5 auf 10^2 Keime je Quadratzentimeter annähernd verdoppeln.

Da der absolute Gewinn an Lagerzeit bei tiefen Temperaturen am größten ist, erhält die Senkung des Anfangskeimgehalts besonders bei Anwendung tiefer Kühltemperaturen zur Erzielung einer langen Lagerfähigkeit praktische Bedeutung. Bei höheren Temperaturen bleiben geringe Anfangskeimgehalte deshalb von Bedeutung, weil hier die Verzögerung des Wachstums durch die Temperatur erheblich schwächer ist.

Die Verhältnisse, die für diese Versuche zugrunde gelegt wurden, sind der Praxis entnommen; denn wie schon oben erwähnt ist, schwankten die Werte des Anfangskeimgehalts auf frischem Fleisch in den hier gewählten Grenzen.

2. Einfluß der Temperatur.

Da die Untersuchungen des Bakterienwachstums in unmittelbarer Nähe des Gefrierpunkts von Fleisch durchgeführt und auf den Einfluß des Gefriervorgangs ausgedehnt werden sollten, haben wir die Wachstumskurven für jeden einzelnen Temperaturgrad zwischen 0 und — 3° festgestellt und durch Versuche bei + 3 und + 6° ergänzt, womit gleichzeitig der Anschluß an die früheren Arbeiten hergestellt wurde. Diese Wachstumskurven beziehen sich also auf ein Gemisch verschiedener, auf dem Fleisch stets vorhandener Bakterienarten, die hauptsächlich in die Micrococcus-, Proteus- und Fluoreszenz-Gruppe gehören.

Da anzunehmen war, daß bei einer Temperatursenkung um jeweils einen Grad der Wachstumsverlauf sich nur in geringem Maße verändert, wurde besonderer Wert auf ein genaues Einhalten eines bestimmten Anfangskeimgehalts zwischen 300 und 1000 Keimen je Quadratzentimeter gelegt. Parallelversuche zeigten gute Übereinstimmung. Auch hier ließ sich durch Vergleichsversuche bei + 6 und bei — 1° C und bei verschiedenen Luftfeuchtigkeiten erneut feststellen, daß sich Unterschiede im Anfangskeimgehalt in den ersten Abschnitten der Wachstumskurve in einer senkrechten Parallelverschiebung der Kurven auswirken.

Der Gefrierpunkt des Fleisches liegt bei etwa — 1° C. Durch vorsichtige Behandlung gelang es, bei — 2° C Versuchsreihen im unterkühlten Zustand durchzuführen. Erst bei — 3° C tritt das Gefrieren spontan ein. Überblickt man zunächst die Versuche mit nicht gefrorenem Fleisch bis — 2° C, so zeigt sich die hemmende Wirkung der Temperatursenkung sehr deutlich in der zunehmenden Verflachung der Wachstumskurven (Abb. 3). Graphisch läßt sich ermitteln, daß der Übergang über den Nullpunkt vollkommen kontinuierlich erfolgt (Abb. 4).

Einen Einblick in die Wirkung des Gefrierens erhält man, wenn unterkühlte und gefrorene Fleischzylinder bei derselben Temperatur verglichen werden. Für die Versuche mit gefrorenem Fleisch wurden die Proben 24 Std., nachdem sie sich im Kühlschrank bereits auf die Endtemperatur abgekühlt hatten, mit kleinen sterilen Eisstücken geimpft. Bei — 1° C ließ sich ein Durchfrieren nicht erzielen, es entstanden nur einzelne kleine Eiskristalle an der Fleischoberfläche. Dagegen gelang es, beide Versuchsreihen (unterkühlt und gefroren) bei — 2° C durchzuführen.

Der Einfluß des Gefrierens zeigt sich zunächst in einem Rückgang des Gehalts an lebenden Keimen, der bei — 2° C nur angedeutet ist, jedoch schon

bei — 3° C klar in Erscheinung tritt (Abb. 3). Die Vorgänge, die sich im Protoplasma der lebenden Zelle abspielen, bestehen vermutlich in einer Plasmaentquellung, die auf den Wasserentzug durch Eiskristallisation zurückzuführen ist. Die Empfindlichkeit des Bakterienplasmas gegenüber derartigen Prozessen ist bekannt, sie findet in der Praxis z. B. darin ihren Ausdruck, daß auf Gefrierfleisch Pilzinfektionen überwiegen. Selbst die Keime, die sich an die veränderten Bedingungen anpassen, nehmen erst nach Verlauf von 10—14 Tagen das Wachstum wieder auf und lassen dann den Keimgehalt allmählich wieder ansteigen. Die Verlängerung der Haltbarkeit ist bereits bei — 2° C so erheblich, daß die Proben nach 26 Tagen den Grenzwert von $10^{7,5}$ noch nicht erreicht hatten.

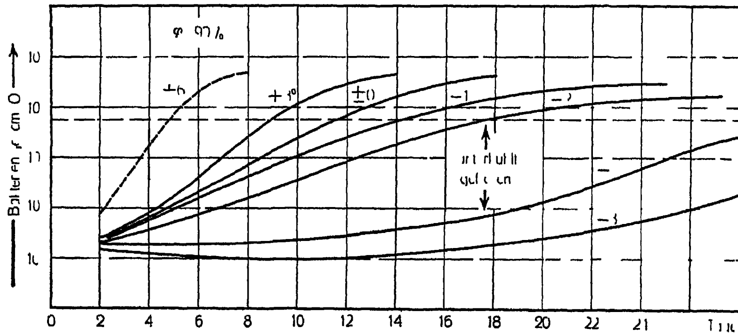


Abb 3. Verlauf des Bakterienwachstums nach verschiedenen Versuchsreihen zwischen + 6 und — 3° C bei $\varphi = 90\%$[1]).

Das Vermögen zur Anpassung ist weniger eine Eigentümlichkeit bestimmter Zellen als vielmehr ein Merkmal einzelner Bakterienarten. Während am Anfangskeimgehalt Kokken und Stäbchen in fast gleichen Mengen beteiligt sind, entwickeln sich auf den gefrorenen Fleischproben fast ausschließlich Kokken.

Vergleicht man den Verlauf der beiden Kurven für — 2° C (s. Abb. 3), so ergibt sich, daß ihr Abstand zu verschiedenen Zeiten verschieden groß ist, d. h. die durch den Gefriervorgang bedingte Hemmung der Bakterienvermehrung, gemessen als Differenz der Keimgehalte im unterkühlten und gefrorenen Zustand, ist bei sonst gleichen Bedingungen von der Lagerdauer abhängig. Sie erreichte

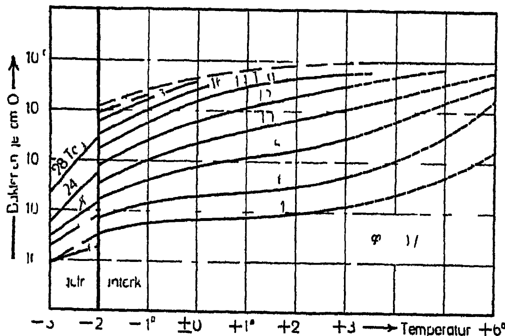


Abb. 4. Der Stand des Bakterienwachstums bei verschiedener Lagerdauer in Abhängigkeit von der Temperatur. Die strich-punktierte Linie gibt die Lage des Hochstwertes der Keimgehalte an[2]).

[1]) Einzelne Wachstumskurven in Abb. 3 sind parallel zur Ordinate verschoben — was nach dem früher Mitgeteilten zulässig ist —, um einen Vergleich sämtlicher Versuchsreihen bei Anfangskeimgehalten derselben Größenordnung zu ermöglichen. Daher sind in dieser Abbildung Versuchspunkte nicht eingezeichnet.

[2]) Vgl. die Fußnote zu Abb. 3.

bei unseren Versuchen ihren höchsten Wert nach einer Lagerdauer von etwa 18 Tagen.

Das Zurückgehen des Gehalts an lebenden Keimen beim Gefrieren hat zur Folge, daß bei der graphischen Darstellung mit der Lagerdauer als Parameter (Abb. 4) eine Diskontinuität beim Übergang vom unterkühlten zum gefrorenen Zustand erscheint.

Aus dem Gesamtverlauf der Kurven geht außerdem hervor, daß sich die relative Wachstumshemmung, d. h. die Wachstumshemmung je Grad Temperatursenkung, dauernd ändert, nicht nur mit der Temperatur, sondern auch mit der Lagerdauer. Während z. B. bei einer Lagerdauer von 4 Tagen ein Absinken der Temperatur von 0 auf — 1° keine Bedeutung hat, verringert sie bei einer Lagerdauer von 16 Tagen den Bakteriengehalt schon um eine Zehnerpotenz.

Bei sämtlichen geprüften Lagerzeiten war die relative Wachstumshemmung zwischen ± 0 und + 2° C geringer als unterhalb des Nullpunktes. Sie war ferner im gesamten Temperaturbereich um so geringer, je kürzer die Lagerdauer war. Zur Erklärung dieser eigenartigen Erscheinung können kaum andere als physiologische Gesichtspunkte herangezogen werden, da weder chemische noch physikalisch-chemische Teilprozesse, die für die Lebenserscheinungen Bedeutung haben, ähnliches Verhalten zeigen. Im Kurvenverlauf oberhalb — 2° C kommt im gekühlten und unterkühlten Zustand die Reaktion der Bakterien auf niedere Temperaturen zum Ausdruck. Bei Versuchsbeginn ist die Hemmung von etwa + 3° C abwärts überall noch annähernd gleichstark. Selbst nach einer Lagerdauer von 4 Tagen unterscheiden sich die Keimgehalte zwischen + 2 und — 1° C erst um ganz geringe Beträge. Zwischen + 2 und + 3° C hat nach dieser Lagerdauer der Prozeß der Anpassung an die niedere Temperatur bereits eingesetzt und zu einem Ansteigen der Bakterienzahl geführt, das bei höheren Temperaturen noch deutlicher wird. Die Hemmung hält also um so länger an, je tiefer die Temperatur ist.

Hier handelt es sich um die Verzögerung der Lebensprozesse durch unmittelbare Temperaturwirkung. An den gefrorenen Proben kommt außer den irreversiblen Schädigungen, die zum Absterben von Zellen und zum vorübergehenden Rückgang des Keimgehalts führen, noch eine weitere Verzögerung hinzu, die auf dem Wasserentzug aus den Zellen beruht.

Der Höchstwert, den die Wachstumskurven überhaupt erreichen, scheint von der Temperatur abhängig zu sein (vgl. Abb. 3 und 4). Er liegt bei $t > 0^0$ bei 10^9 bis 10^{10} Keime je Quadratzentimeter, bei $t < 0^0$ ungefähr eine Zehnerpotenz tiefer. Noch nicht veröffentlichte Versuche, die an Fischen ausgeführt worden sind, deuten ebenfalls auf das Vorhandensein einer Temperaturabhängigkeit der Höchstwerte.

3. Der Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit.

Der Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit auf einen feuchten Körper ist von der Differenz der Partialdrucke an der Oberfläche und in der umgebenden Luft abhängig. Je größer die Differenz, desto stärker ist das Bestreben nach einem Ausgleich der Partialdrucke und desto schneller tritt die Einwirkung der Luftfeuchtigkeit auf den Körper in Erscheinung. Mit sinkender Temperatur werden die Dampfdrucke über Wasser und über Lösungen kleiner, desgleichen die Druckdifferenzen zwischen zwei verschiedenen Lösungen bei gleicher Temperatur. Dieser Einfluß zeigt sich am

deutlichsten in der Verringerung der Gewichtsverluste unter sonst gleichen Bedingungen bei sinkender Temperatur. Ebenso nimmt der Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit auf das Bakterienwachstum mit sinkender Temperatur ab[1]). Während sich bei t = ± 0° und bei — 1° C und selbst bei — 2° C noch deutlich der Einfluß relativer Luftfeuchtigkeiten von 70 bis annähernd 100% feststellen läßt (Abb. 5, 6), liegen bei — 3° C in den Versuchen mit gefrorenem Fleisch die Werte für φ = 80, 90 und etwa 100% nahe beisammen oder überlagern sich, so daß eine Abhängigkeit des Wachstums von der relativen Luftfeuchtigkeit nicht erkennbar ist (Abb. 7).

Gegenüber der mit dem Übergang vom unterkühlten in den gefrorenen Fleischzustand verbundenen Wachstumshemmung tritt der Einfluß der relativen Feuchtigkeit ganz zurück.

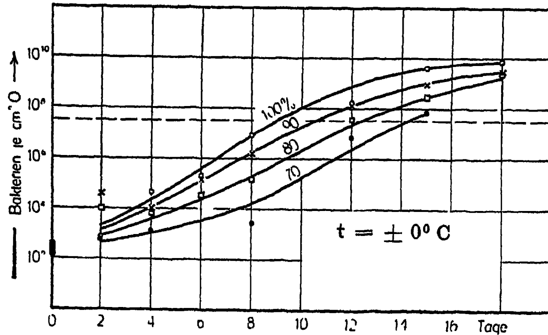


Abb. 5. Einfluß verschiedener Luftfeuchtigkeiten über gekühltem Fleisch auf das Bakterienwachstum bei t = ± 0° C.

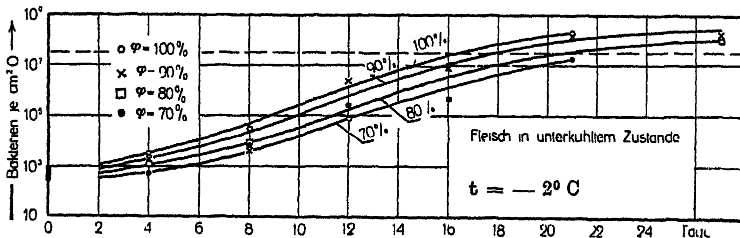


Abb. 6. Einfluß verschiedener Luftfeuchtigkeiten über unterkühltem Fleisch auf das Bakterienwachstum bei t = — 2° C.

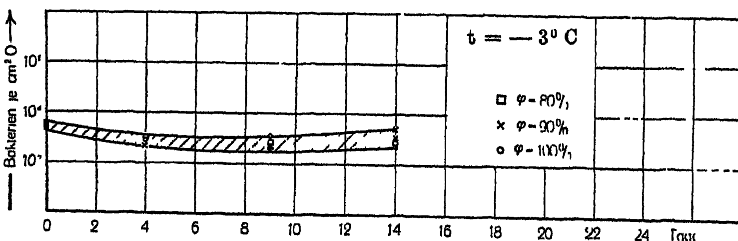


Abb. 7. Einfluß verschiedener Luftfeuchtigkeiten über gefrorenem Fleisch auf das Bakterienwachstum bei t = — 3° C.

4. Verhalten der Bakterien bei wasserdampfgesättigter Luft bzw. bei niederen osmotischen Drucken.

Bei den Versuchen mit Fleischzylindern entwickeln sich die Bakterien in der dünnen Flüssigkeitsschicht an der Fleischoberfläche, deren Konzen-

[1]) Hierbei ist das Verhältnis von Oberfläche zu Gewicht bei den Versuchsstücken mitbestimmend.

tration auf indirektem Wege durch Regulierung der relativen Feuchtigkeit in der Umgebung des Fleisches verändert wird. Bestimmend für das Bakterienwachstum ist der osmotische Druck in dieser Nährlösung.

Als optimale Feuchtigkeit für das Bakterienwachstum gilt seit den Untersuchungen von Walter (1924) der Grenzwert von 100%. Da inzwischen Kaeß und Schwartz (1935) gezeigt haben, daß bei Schimmelpilzen ein unterhalb von 100% gelegenes Optimum vorhanden ist und die Wachstumskurven nach Überschreiten des Optimums rasch sinken, lag es nahe, auch bei Bakterien Versuche in dieser Richtung zu unternehmen. Die experimentellen Schwierigkeiten sind hier allerdings erheblich größer, da das Feuchtigkeitsoptimum vermutlich noch näher an den Grenzwert von 100% heranrückt als bei Schimmelpilzen[1]).

Wir haben Vorversuche mit der Reinkultur eines von Fleisch isolierten Micrococcus-Stammes ausgeführt. Als Nährlösung dienten Fleischbouillon bzw. Fleischwasser, deren osmotischer Druck durch Zugabe von Ringerlösung verschiedener Konzentration oder von destilliertem Wasser in beliebiger Weise eingestellt werden konnte. Die Bestimmung der Bakterienvermehrung erfolgte auf dem Weg über die Plattenkultur. Versuche bei $+ 3^0$ C ergaben, daß oberhalb eines osmotischen Drucks von 3,1 at, der einer relativen Luftfeuchtigkeit von $\varphi = 99{,}75\%$ entspricht, eine deutliche Verminderung des Bakterienwachstums eintritt. Damit ist wenigstens für eine Bakterienart das Vorhandensein eines Optimums unterhalb $\varphi = 100\%$ nachgewiesen, wenn auch seine genaue Lage noch nicht bestimmt werden konnte.

Zusammenfassung.

1. Wachstumskurven mit verschiedenem Anfangskeimgehalt zeigen in ihrem Beginn und im mittleren Teil annähernd parallelen Verlauf. Die Unterschiede im Anfangskeimgehalt gleichen sich erst nach Überschreiten der Haltbarkeitsgrenze im letzten Drittel der Wachstumskurven aus.

2. Lagertemperaturen im Bereich des Gefrierpunktes bewirken eine starke Hemmung des Bakterienwachstums auf gekühltem und unterkühltem Fleisch. Je tiefer die Temperatur ist, desto langsamer wird die Wachstumshemmung überwunden.

3. Beim Übergang in den gefrorenen Zustand wird ein Teil der Bakterien irreversibel geschädigt, so daß der Keimgehalt zunächst absinkt, was bei -2^0 C nur in geringem Maße der Fall ist, jedoch schon bei -3^0 C deutlich in Erscheinung tritt. Die überlebenden Bakterien nehmen ihr Wachstum wieder auf und bewirken ein erneutes Ansteigen der Keimgehalte.

4. Der Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit nimmt unter den gegebenen Versuchsbedingungen zwischen $t = \pm 0$ und -2^0 C mit sinkender Temperatur ab und läßt sich auf gefrorenem Fleisch in dem untersuchten Bereich von $\varphi = 80$ bis annähernd 100% nicht mehr sicher feststellen.

5. Versuche mit einem Micrococcus-Stamm ergaben ein Wachstumsoptimum bei einem osmotischen Druck zwischen 3,1 und 1,45 at, was einem Feuchtigkeitsbereich zwischen φ 99,75 und 99,88% entspricht.

6. Für die Praxis ergeben sich hieraus folgende Gesichtspunkte: Die Lagertemperatur soll in Fleischkühlräumen so tief sein, wie es zur Vermeidung des Gefrierens gerade noch zulässig ist. Von größter Bedeutung

[1]) Bei Penicillium flavoglaucum liegt das Optimum nach Kaeß und Schwartz etwa bei 99,3%.

ist es, den Anfangskeimgehalt moglichst niedrig zu halten, weil dadurch, besonders bei tiefen Temperaturen, die Lagerdauer wesentlich verlangert werden kann.

Literaturverzeichnis.

Haines, R. B, Rep of the Food Investigation Board, 1931 p 46 London 1932. — Haines, R B, and Smith, E. C., Rep of the Food Investigation Board, 1932. p. 18 London 1933. — Kaeß, G. und Schwartz, W., Arch f Mikrobiol Bd. 6. 1935. S 208. — Putter, A, Die Auswertung zahlenmaßiger Beobachtungen in der Biologie Berlin 1929. — Schwartz, W. und Schmid, W, Arch. f. Mikrobiol. Bd. 2. 1931. S. 568. — Schwartz, W. und Loser, E, Zentralbl. f. Bakt, II. Abt. Bd. 91. 1935. S. 395. — Stewart, M. M, Rep of the Food Investigation Board, 1933. p 179. London 1934. — Walter, H, Ztschr f Bot. Bd. 16. 1934. S. 353.

Nachdruck verboten.

Polarographische Analyse der Bakterienextrakte.

[Aus dem pflanzenphysiologischen Institute der Karls-Universitat in Prag.]

Von **J. Kořínek** und **J. Babička.**

Mit 4 Abbildungen im Text.

Mittels der polarographischen Methode nach J. Heyrovský haben wir früher die Gärungsprodukte studiert, die in Zuckerlosungen durch die Wirkung der Bakterien entstehen. Diesmal berichten wir uber die polarographische Analyse der Bakterienextrakte (1), die wir entweder durch Autolyse oder durch Kochen bekommen haben. Wir haben mehr als 250 Analysen durchgefuhrt, erwähnen aber nur einige typische Beispiele.

Bei unseren Versuchen haben wir zwei verschiedene Prinzipien berucksichtigt: erstens die Herabdrückung des Sauerstoffmaximums und zweitens die Elektrolytenkonzentrations-Abnahme. Die durch Autolyse aus den Bakterien herausdiffundierten Stoffe sind mehr oder weniger oberflächenaktiv. Oberflächenaktive Stoffe haben die Fahigkeit, das Maximum der Sauerstoffabsorption zu ändern, was sich polarographisch feststellen läßt. Die Metallionen reagieren mit der organischen aus den Bakterien durch Autolyse oder durch Kochen herausdiffundierten Substanz. Es entstehen dadurch Komplexe metallorganischer Verbindungen und die Konzentration der freien Metallionen nimmt ab.

Die polarographische Methode hat sich in beiden Fällen als sehr geeignet gezeigt, denn sie ermöglicht die Registrierung von derart kleinen Änderungen, die sich durch keine chemische Methode feststellen lassen.

Die Bakterien zu unseren Versuchen wurden auf gewöhnlichem Bouillonagar kultiviert und mit der Reinkultur wurden Elektrolytlösungen geimpft. Die Menge der Lösung sowie die Zahl der Bakterienösen ist angegeben. Die Bakterienaufschwemmung haben wir entweder einige Zeit bei 37° stehen lassen — die Bakterien wurden auf diese Weise der Autolyse unterworfen — oder die Aufschwemmung wurde 15 Min. bei 120° C gekocht. Die Bakterienkorper wurden auf diese Weise extrahiert. Wir haben mit folgenden Mikroben gearbeitet: B. prodigiosum, B. coli, B. pyocyaneum, Bacillus anthracoides, B. mycoides, Sarcina lutea,

Mycobacterium smegmatis, M. Pellegrini, M. poikilothermorum Friedmann, Saccharomyces cerevisiae.

Bei der Anwendung der Cu-Verbindungen waren schon äußerliche Unterschiede in der Farbung des Bakteriensedimentes sichtbar. Sediment von M. poikilothermorum Friedmann hat sich grun gefarbt. M. smegmatis grunlich, M. Pellegrini graubraun, B. mycoides braun, B. prodigiosum rotlich-grun, Sarcina lichtgelb, B. pyocyaneum sepia-braun. Diese Farbanderung war in m/10000 $CuCl_2$-Losung sichtbar.

Das Polarogramm I beweist, daß die Autolyseprodukte der Bakterien die Fahigkeit haben, das Sauerstoffmaximum zu unterdrucken. Kurve 1 ist die Kontrollkurve der Losung — n/500 NaOH —, in der die Bakterien aufgeschwemmt wurden. Die Analyse wurde bei Luftanwesenheit durchgefuhrt; die Empfindlichkeit des Galvanometers war 1/50. Wir sehen, daß der Sauerstoff bei sehr geringer motorischer Kraft reduziert wird. Deswegen sehen wir schon am Anfang der Kurve eine bedeutende Stromsteigung.

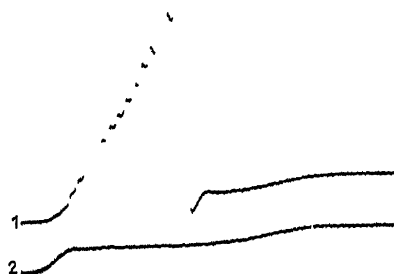


Abb 1

Kurve 2 stellt dieselbe Lösung dar, der 3 Ösen von Sarcina lutea zugesetzt wurden. Der Kontrollversuch sowie der Versuch mit der Sarcina wurden nach 48 Std. durchgefuhrt. Man sieht, daß zwischen den beiden Kurven ein bedeutender Unterschied existiert, dessen Ursache wir sicher in der Einwirkung der Autolyseprodukte der Sarcina lutea suchen mussen.

Das Polarogramm II stellt folgenden Versuch dar: Wir haben mit n/2000-Lösung von NaOH gearbeitet. Die Aufschwemmung der Bakterien wurde entweder 8 Tage bei Zimmertemperatur gelassen oder sie wurde 15 Min. bei 120° C gekocht. Links sehen wir die Kurven der nicht gekochten, rechts die Kurven der gekochten Proben.

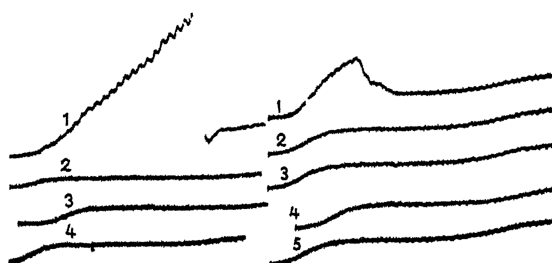


Abb 2

Unterschiede zwischen den beiden Fällen sind nur gering. Kurve 1 stellt die Kontrolle dar, Kurve 2 B. prodigiosum, Kurve 3 B. pyocyaneum, Kurve 4 Sarcina lutea. Kurve 5 ist M. tuberculosis poikilothermorum Friedmann. Man sieht, daß die Kurven der Kontroll-Lösung sich von den Kurven der Bakterienaufschwemmungen unterscheiden, die letzten sind niedriger. Das erklären wir uns dadurch, daß in den Aufschwemmungen sehr bald organische Stoffe auftreten, einerlei, ob durch Autolyse oder durch Extraktion beim Kochen, und diese Stoffe unterdrücken bald das Sauerstoffmaximum.

Daß in dieser Fähigkeit auch Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienarten bestehen, das zeigt uns das Polarogramm III. Es wurde bei der Galvanometer-Empfindlichkeit 1/30 mit der n/1000 NaOH-Lösung gearbeitet. Kurve 1 ist die Kontrolle, Kurve 2 ist B. prodigiosum, Kurve 3 B. pyocyaneum, Kurve 4 Sarcina lutea. Bei der letzteren ist die Fähigkeit, das Sauerstoffmaximum herabzudrücken, nicht so groß wie bei B. prodigiosum und B. pyocyaneum.



Abb 3.

Bezüglich der Messung der Zahl der freien Metallionen in der Lösung sind wir folgendermaßen vorgegangen. Wir haben zunächst n/1000-Lösung von $CuCl_2$ zubereitet. In der Lösung wurden die Bakterien aufgeschwemmt und bei 120° C 15 Min. gekocht. Durch das Kochen wurden die Bakterien extrahiert, und die aus den Bakterienkörpern herausdiffundierte organische Substanz bildet mit den Cu-Ionen komplexe Verbindungen. Auf diese Weise nimmt in der Lösung die Menge der freien Metallionen ab. Durch die polarographische Methode läßt sich schon eine sehr geringe Ionenabnahme feststellen.

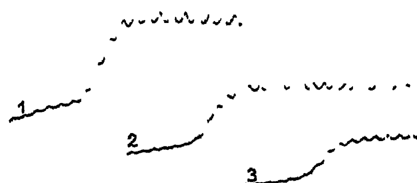


Abb. 4

Als Beispiel kann uns das Polarogramm IV dienen. Kurve 1 ist die Kontrolle, Kurve 2 Sarcina lutea, Kurve 3 B. prodigiosum. Die höchste Welle entsteht beim Kontrollversuch, d. h. in der Lösung ohne Bakterien. Es wurde gearbeitet bei der Galvanometerempfindlichkeit 1/4. (Polarogramm IV.)

Zusammenfassung.

Bei der Autolyse sowie beim Kochen diffundieren aus den Bakterien organische Stoffe heraus. Diese Stoffe drücken das Sauerstoffmaximum der Lösung herab, was sich polarographisch feststellen läßt. Die gleichen Substanzen bilden mit den Metallionen komplexe Verbindungen. Auf diese Weise nimmt die Menge der freien Metallionen ab, was sich ebenfalls polarographisch bestimmen läßt. In beiden Fällen ist die polarographische Methode äußerst empfindlich.

Literatur.

Kořínek, J. und Babička, J., Polarographische Analyse der Mikrobenkulturflüssigkeiten. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 89. 1934. S. 498—501.)

Nachdruck verboten.

Über die Wahrscheinlichkeit der Reinkulturisolierung aus einer Petrischale[1]).

Von **T. Matuszewski, J. Supińska**
aus dem Institut für Gärungsgewerbe und landwirtschaftliche Bakteriologie beim Museum für Gewerbe und Landwirtschaft, Warschau

und **J. Neyman**
aus der Abteilung für angewandte Statistik der Universität London.

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Einleitung.

Die vorliegende Arbeit bezweckt die Beantwortung der Frage, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, daß eine einzelne, in der Petrischale entstandene Kolonie eine Reinkultur ergeben kann.

In den letzten Jahren wurden einige Methoden der Reinkulturisolierung aus einer mikroskopisch kontrollierten Einzelzelle bearbeitet, die Plattenmethode aber findet, dank ihrer Einfachheit und Allseitigkeit, dauernd allgemeine Anwendung.

Als Grundlage für unsere Berechnungen dienten die zur Analyse der Kolonienverteilung auf einzelnen Schalen angewendeten statistischen Methoden. Insbesondere wurden die Konsequenzen des Poissonschen Gesetzes (Gesetz der kleinen Zahlen) (1) angewendet. Denn, eine gut, oder — besser gesagt — ideal vermischte Suspension von Kleinlebewesen wird durch eine spezielle Verteilung der Keime in gleich großen Proben charakterisiert, welche rein zufällige, von dem obengenannten Poissonschen Wahrscheinlichkeitsgesetz bestimmte Schwankungen aufweisen. Sind aber dieselben Schwankungen nicht rein zufällig, wobei sie von verschiedenen methodischen und biologischen Faktoren abhängen, so wird die betreffende Suspension als schlecht vermischt betrachtet und die Konsequenzen des Poissonschen Wahrscheinlichkeitsgesetzes finden offenbar keine Anwendung.

Nach den Voraussetzungen der Wahrscheinlichkeitsrechnung unterliegen dem Poissonschen Gesetz solche Versuche, in welchen die Wahrscheinlichkeit einer gewissen Erscheinung sehr klein ist, die mögliche Anzahl des Auftretens derselben Erscheinung dagegen sehr groß ist. Und zwar ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein gewisser Keim der Mikrobensuspension sich in einer bestimmten Volumeneinheit befindet, ungemein klein; wogegen in einzelner Volumeneinheit sich viele Keime befinden können.

In der Literatur finden wir Beweise, daß eine Mikrobensuspension größere oder kleinere Übereinstimmung mit dem Poissonschen Gesetz aufweisen kann. Bei Aussaat einer Suspension mittels der Verdünnungsmethode tritt große Übereinstimmung auf (4. 11), nicht so beständig ist sie bei der Aussaat auf parallelen Platten (2) und in dem Haemozytometer (10), noch weniger regelmäßig im Ausstrichpräparat aus Milch und Milchprodukten (5).

Für jede Methode, in welcher die Keimverteilung zum Ausdruck kommt, muß man also, bevor man das erwähnte Wahrscheinlichkeitsgesetz benutzt,

[1]) Über dasselbe Thema, aber in einer anderen Bearbeitung, wurde auf dem XIV. Polnischen Kongreß der Ärzte und Naturwissenschaftler und in der Zeitschrift „Medycyna Doświadczalna i Społeczna" in polnischer Sprache berichtet.

spezielle Versuche durchführen, in denen empirisch geprüft wird, ob diese Verteilung dem genannten Gesetz unterliegt.

II. Analyse der Kolonienverteilung auf den Platten.

Die Analyse der Übereinstimmung der Kolonienverteilung mit dem Poissonschen Gesetz (Repräsentationsanalyse) kann man nach folgender Formel durchführen:

$$\chi^2 = \sum \frac{(m - m')^2}{m}, \tag{1}$$

wo m' — die in dem Versuche beobachtete Zahl der Felder gewisser Dimensionen mit einer gegebenen Zahl der Kolonien, m — die theoretische Zahl derselben Felder bezeichnet, die nach den von K. Pearson (8) veröffentlichten Poissonschen Wahrscheinlichkeitstabellen berechnet ist.

Auf Grund des Wertes χ^2 finden wir in den Eldertons Tabellen, die auch Pearson (9) zitiert, die Werte (exakter — die obere Grenze) der Wahrscheinlichkeit P, welche zeigt, ob die Hypothese der Übereinstimmung als annehmbar betrachtet werden kann. Kleine Werte von P, z. B.: $< 0{,}02$ oder $< 0{,}05$ zeigen, daß die Hypothese nicht zuverlässig ist. Dagegen geben Werte, die größer als 0,05 sind, keinen Anlaß, die Hypothese zu verwerfen.

Wenn Zahlengrößen der Klassen mit gewisser Kolonienanzahl geringer als 7—10 sind, so summiert man die betreffenden Werte. Nach Neyman und Pearson (7) nimmt man die Anzahl der sog. Freiheitsgrade, die man in Eldertons Tabellen zu benutzen hat, als gleich der Anzahl von Klassen — 2 an. In dieser Weise muß, wenn n die Zahl der Klassen bedeutet, Eldertons n' als n' = n — 1 angenommen werden (in den Tabellen von Elderton bedeutet n' die Zahl der Freiheitsgrade + 1).

Die empirischen Werte m' bei der Analyse der Kolonienverteilung auf Platten bestimmte man in der Weise, daß die Platte auf Millimeterpapier gestellt wurde und die Anzahl der Quadrate von gleicher Größe (0,5—1 cm Seitenlänge) mit 0, 1, 2, 3 usw. Kolonien mit bloßem Auge berechnet wurde. Waren die Platten dicht ausgesät, so bestimmte man einige Hundert der Gesichtsfelder mit 0, 1, 2, 3 usw. Kolonien mittels der Lupe.

Die Tab. 1 gibt die Ergebnisse solcher Analysen für einige Platten. Wir sehen, daß der Wert P in allen Fällen die Übereinstimmung der Kolonienanordnung mit dem Poissonschen Gesetz bestätigt.

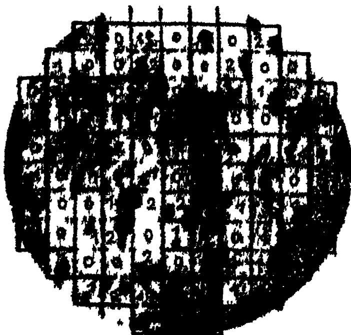


Abb. 1

Auf Grund derselben Analysen mit mehreren, zufällig im Laboratorium sich befindenden Platten stellten wir fest, daß diese Übereinstimmung immer, ohne Ausnahme, stattfand. Der kleinste erhaltene Wert von P war 0,19. Sogar auf einer Platte, die während des Erstarrens absichtlich schräg gelegt wurde, so daß eine gleichmäßige Verteilung der Kolonien verhindert war, blieb diese Verteilung mit dem Poissonschen Gesetz im Einklang (s. Tab. 2). Wir fügen auch die Photographie der Platte aus der Arbeit von

Tab. 1. Kolonienverteilung auf den Platten und ihr Vergleich mit dem Poissonschen Gesetz

k	Agarplatten 1 Schizosacch. Pombe m'	m	2 Strept. lactis m'	m	3 Thermob. helvetic. m'	m	4 Bact. fluorescens m'	m	5 Hefe u. Bakterien m'	m	k
0	5	6,1	26	27,5	59	55,6	83	75,0	0 }5	4,6	0
1	19	18,0	40	42,2	86	82,2	134	144,5	5		1
2	26	26,7	38	32,5	49	60,8	135	139,4	9	11,0	2
3	26	26,4	17	16,7	30	30,0	101	89,7	23	20,9	3
4	21	19,6	5 }7	9,1	15		40	43,3	33	29,6	4
5	13	11,7	2		3 }20	15,4	16	16,7	32	34,0	5
6	4				2		3		32	31,8	6
7	3 }8	9,5					2 }7	7,4	24	25,8	7
8	1						2		13	18,3	8
9									12	11,6	9
10									8	6,7	10
11									7 }9	5,7	11
12									2		12
k	Gelatineplatten 6 Sacch. cerevisiae m'	m	7 Bact. Beijerincki m'	m	8 Bact. Maerck m'	m	9 Bact. rancens m'	m	10 Bewegliche Stäbchen m'	m	k
0	8	6,8	0 }12	10,3	7	3,9	3	2,1	60	62,6	0
1	16	16,2	12		11	10,4	7	8,2	80	75,8	1
2	18	19,2	18	16,7	11	13,7	14	15,8	45	45,8	2
3	15	15,1	13	22,4	11	12,0	21	20,2	16	18 5	3
4	9	9,0	27	22,7	7	7,9	20	19,5	8 }9	7,3	4
5	4		19	18,3	3		19	15,0	1		5
6	2 }7	6,7	16	12,3	2		7	9,6			6
7	0		6		1 }8	7,1	6				7
8	1		4 }11	13,3	1		1 }9	9,6			8
9			1		1		0				9
10							2				10
Platten-Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
χ^2		0,77	1,61	4,05	3,47	4,94	0 30	6,67	3,21	2,63	1,09
P		0,97	0,66	0,26	0,63	0,84	0,97	0,25	0,53	0,85	0,78

k = Kolonienanzahl im Gesichtsfeld, m' = die beobachtete Gesichtsfelderanzahl, m = die theoretische Gesichtsfelderanzahl

P = obere Grenze der Fehlerwahrscheinlichkeit, falls wir die Poissons-Gesetzhypothese verwerfen

Tab. 2. Kolonienverteilung auf einer schräg ausgegossenen Platte.

k	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
m'	6	20	15	24	25	18	7	2 (13)	4	$\chi^2 = 7{,}50$
m	4,5	14,7	24,3	26,7	22,1	14,6		14,1		P = 0,19

Maurizio und Staub (6) bei (Abb. 1), mit eingezeichneten Quadraten und eingeschriebenen Zahlen der Kolonien. Aus der Tab. 3 geht hervor,

die Kolonienverteilung auch hier dem Poissonschen Gesetz gehorcht. Auch die Plattenphotographie in der Arbeit von Kellerman und McBeth (3) weist gute Übereinstimmung der Kolonienverteilung mit diesem Gesetz auf (siehe Tab. 3).

Tab. 3. Kolonienverteilung auf den Plattenphotographien.

k	Aus der Arbeit von			
	Maurizio und Staub		Kellerman und McBeth	
	m′	m	m′	m
0	41	40,5	63	63,2
1	37	37,0	27	27,0
2	15	16,8	6	5,8
3	7 } 8	6,5	1	1,0
4	1 }			
	$\chi^2 = 0{,}54$ $P = 0{,}79$		$\chi^2 = 0{,}01$ $P = 0{,}996$	

Aus dem Gesagten geht hervor, daß man annehmen kann, daß bei gewöhnlichem Plattenverfahren eine Verteilung der Keime erhalten wird, die regelmäßige Üerbeinstimmung mit dem Poissonschen Gesetz aufweist.

III. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit der Kolonienreinheit.

Das Gesetz von Poisson wird durch die folgende Formel dargestellt:

$$P_k = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!}, \tag{2}$$

wo P_k — die Wahrscheinlichkeit, daß im gegebenen Flüssigkeitsvolumen genau k-Individuen enthalten sind, λ — die wirkliche Durchschnittszahl der Individuen in der Flüssigkeit pro Volumen, e — die Basis der natürlichen Logarithmen bezeichnet.

Zwecks Benutzung der Konsequenzen dieser Formel setzen wir anfänglich voraus, daß die Kolonien auf einer Oberfläche liegen und daß sie alle denselben Durchmesser haben. Wir berechnen weiter das Verhältnis der kolonienfreien Oberfläche zur ganzen Oberfläche der Platte. Der Durchmesser einer Kolonie sei b, der Durchmesser der Platte a, die Kolonienanzahl auf der Platte — w. Das erwähnte Verhältnis s wird also lauten:

$$s = \frac{(0.5\,a)^2\pi - (0{,}5\,b)^2\pi w}{(0{,}5\,a)^2\pi}, \tag{3}$$

was nach Vereinfachung ergibt:

$$s = 1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2 w. \tag{4}$$

Was gibt uns der erhaltene Wert s?

Wir können folgende Erwägung durchführen:

Wie bewiesen wurde, sind die in Gesichtsfeldern verschiedener Größe beobachteten Kolonien übereinstimmend mit dem Poissonschen Gesetz verteilt. Wir können uns also vorstellen, daß es möglich ist, solche Dimensionen der Gesichtsfelder anzupassen, die genau der Dimension der Kolonie gleich werden. Wir unterscheiden zwar nicht diejenigen Kolonien, welche

aus 1, 2, 3 usw. Keimen entstanden sind, unterscheiden jedoch ganz genau die Felder (mit den Kolonien gleicher Dimensionen!), die keine 0-Keime enthalten. Das berechnete Verhältnis s gibt uns den Wert, der bezeichnet, welcher Teil dieser kolonienfreien Oberfläche dem einzelnen Feld zukommt. Es bezeichnet also den empirischen Wert P_o, d. h. die Wahrscheinlichkeit, daß sich im gegebenen Gesichtsfelde keine Kolonie befinden wird. Daraus folgt

$$P_o = 1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2 w. \tag{5}$$

Diesen empirischen Wert P_o können wir mit dem aus der Gleichung (2) erhaltenen Wert P_o vergleichen:

$$1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2 w = e^{-\lambda}. \tag{6}$$

Wir bestimmen weiter den Wert λ:

$$\lambda = \frac{-\log\left[1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2 w\right]}{\log e} \tag{7}$$

und weil
$$P_1 = e^{-\lambda}\lambda = P_o \lambda, \tag{8}$$

ist, erhalten wir
$$P_1 = \left[1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2 w\right] \frac{-\log\left[1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2 w\right]}{\log e}. \tag{9}$$

Der Wert P_1 drückt die Wahrscheinlichkeit aus, daß sich im jeweiligen Felde nur ein Individuum befinden wird. Da aber die gesamte Anzahl der Felder $\left(\frac{a}{b}\right)^2$ ist, wobei w Felder Kolonien enthalten, so können wir die gesuchte Wahrscheinlichkeit der Kolonienreinheit P_R in folgender Gestalt ausdrücken:

$$P_R = P_1 \left(\frac{a}{b}\right)^2 \frac{1}{w}. \tag{10}$$

Der Wert P_R gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß eine Kolonie nur von einem Individuum stammt.

Z. B. annehmend, daß der Durchmesser der Platte $\doteq$ 10 cm, die Anzahl der Kolonien = 1000, der Durchmesser der Kolonien = 1 mm ist, bekommen wir:

$$\begin{aligned} P_o &= 1 - \left(\frac{1}{100}\right)^2 1000 = 0{,}90, \\ \lambda &= \frac{-\log 0{,}90}{0{,}4342945} = 0{,}10536283, \\ P_1 &= 0{,}90 \times 0{,}10536283 = 0{,}09483, \\ P_R &= 0{,}09483 \left(\frac{100}{1}\right)^2 \frac{1}{1000} = 0{,}9483. \end{aligned} \tag{11}$$

Wenn wir aus 100 Kolonien Abimpfungen machen, bekommen wir — im gegebenen Fall — durchschnittlich 95 Reinkulturen und 5 Kulturen, die nicht als Reinkultur betrachtet werden können.

Wie ersichtlich ist, hängt der Wert P_R 1. von den Dimensionen der Kolonie, 2. von der Anzahl der Kolonien, 3. von den Dimensionen der Platte ab. Wir haben für Laboratoriumszwecke die Tab. 4 bearbeitet, in der sich die entsprechenden Wahrscheinlichkeitswerte, bei verschiedenen obengenannten Ausgangsdaten befinden.

Tab. 4. Wahrscheinlichkeiten, daß eine Kolonie aus einem Individuum entstanden ist (P_R).

Anzahl der Kolonien	Durchmesser der Kolonien mm						
	0,25	0,50	0,75	1,0	2,0	3,0	4,0
	Durchmesser der Platte 10,0 cm						
25	0,9999	0,9997	0,9993	0,9988	0,9950	0,9887	0,9797
50	0,9998	0,9994	0,9986	0,9975	0,9899	0,9767	0,9589
100	0,9997	0,9987	0,9972	0,9950	0,9797	0,9536	0,9154
250	0,9992	0,9969	0,9929	0,9874	0,9483	0,8780	0,7662
500	0,9984	0,9937	0,9858	0,9746	0,8926	0,7307	0,4024
1 000	0,9969	0,9874	0,9713	0,9483	0,7662	0,2558	die Platte
2 500	0,9921	0,9681	0,9261	0,8630	ist gänzlich mit Kolonien		
5 000	0,9842	0,9347	0,8439	0,6931	bewachsen		
10 000	0,9681	0,8630	0,6430				
	Durchmesser der Platte 9,0 cm						
25	0,9999	0,9996	0,9991	0,9985	0,9939	0,9859	0,9749
50	0,9998	0,9992	0,9983	0,9969	0,9875	0,9716	0,9489
100	0,9996	0,9985	0,9965	0,9938	0,9556	0,9422	0,8940
250	0,9990	0,9961	0,9913	0,9844	0,9319	0,8461	0,6979
500	0,9981	0,9922	0,9824	0,9684	0,8642	0,6487	0,0549
1 000	0,9961	0,9844	0,9644	0,9319	0,6912		
2 500	0,9903	0,9603	0,9094	0,8268	die Platte		
5 000	0,9805	0,9185	0,7650	0,5955	ist gänzlich mit Kolonien		
10 000	0,9604	0,8268	0,5208		bewachsen		

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Die ganze Berechnung sowie die Tabellen haben wir bei folgenden Voraussetzungen bearbeitet: 1. die Kolonien liegen in derselben Ebene, 2. die Kolonien haben gleiche Dimensionen.

Man muß also vor allem diskutieren in welchem Grade, bei Anwendung der erhaltenen Werte, diese theoretischen Voraussetzungen Bedeutung für die Laboratoriumspraxis haben können. Bei gewöhnlichen Bedingungen des Plattenverfahrens ist die Schicht der Nährböden einige Millimeter dick, weshalb die Kolonien höher oder niedriger liegen, sowie auch verschiedene Dimensionen aufweisen können.

Es geht daraus hervor, daß dank der Kolonienverteilung in der Schicht des Nährbodens die wirkliche Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Kolonie aus einem Individuum größer ist als es die Tab. 4 angibt. Wir glauben jedoch, daß die Einführung der entsprechenden Korrekturen zwecklos wäre, mit Hinsicht auf die technischen Schwierigkeiten der Abimpfung aus einer gegebenen Kolonie, ohne Berührung einer unter ihr gelegenen Kolonie. Mit Rücksicht darauf ist es richtiger, die Wahrscheinlichkeit zu unterschätzen als zu überschätzen.

Die Verschiedenheit der Koloniengröße auf der Platte (die zwar nicht immer bedeutend ist), soll ausführlicher betrachtet werden, weil die Anwesenheit der größeren Kolonien, als die zur Abimpfung ausgewählte, eine

Überschätzung des Wertes P_R hervorrufen kann. Da die Möglichkeit besteht, daß die kleinen Kolonien durch große bedeckt sein können, kann die Zählung der Anzahl von Individuen (des Wertes w) fehlerhaft ausfallen.

Die Konsequenzen des Poissonschen Gesetzes können uns in dieser Hinsicht gleichfalls entsprechende Anweisungen liefern. Wir können nämlich die Summe der Wahrscheinlichkeiten des Auftretens von 2, 3, 4 usw. Individuen in einem Felde finden:

$$\sum_{k \geqslant 2} P_k . \tag{12}$$

Da wir aber in jeder Kolonie schon ein Individuum gezählt haben, multiplizieren wir jeden Wert P_k mit $k - 1$:

$$\sum_{k \geqslant 2} P_k (k - 1). \tag{13}$$

Multiplizieren wir weiter diese Summe mit der gesamten Anzahl der Felder, so erhalten wir die Anzahl der Individuen, welche man zur Anzahl der berechneten Kolonien addieren muß, um die wirkliche Anzahl der ausgesäten Individuen zu bekommen. Diese Korrektur u können wir, nach einigen Vereinfachungen wie folgt ausdrücken:

$$u = \left(\frac{a}{b}\right)^2 (\lambda + P_0 - 1). \tag{14}$$

Für das oben zitierte Beispiel erhalten wir:

$$u = \left(\frac{100}{1}\right)^2 (0{,}10536283 + 0{,}90 - 1) = 53{,}6. \tag{15}$$

So ist, obgleich die berechnete Zahl der Kolonien 1000 war, die wirkliche Zahl der ausgesäten Individuen wahrscheinlich gleich 1054.

Wenn die Kolonien gleiche Durchmesser haben, ist diese Korrektur unnötig, weil wir bei Berechnung von P_1 automatisch die Werte P_2, P_3, P_4 usw. berücksichtigten. Sollten aber die Kolonien nicht gleich sein, so ist die entsprechende Korrektur notwendig. Man kann z. B. zur Abimpfung eine Kolonie von 1 mm Durchmesser auswählen, während der hauptsächliche Teil der Kolonien auf dieser Platte 2 mm Durchmesser aufweist. Man muß dann die Korrektur der Kolonienanzahl für letztere Dimension berechnen. Mit Hinsicht darauf, haben wir die Tab. 5 der Korrekturen für die Kolonienanzahl bei denselben Ausgangsdaten, wie in der Tab. 4 bearbeitet.

Es ist leicht ersichtlich, daß die Tab. 5 auch zur Keimzahlbestimmung mittels der Plattenmethode dienen kann. Nach Addition der Korrekturen zu der berechneten Anzahl der Kolonien, kommen wir zur wirklichen Individuenanzahl, obgleich ein Teil von Kolonien aus mehreren Individuen entstanden ist. Da aber die Voraussetzungen, daß die Kolonien in gleicher Ebene liegen und gleiche Dimensionen haben, nur selten erfüllt sind, gibt uns die Korrektur keine genügend genauen Daten und wir müssen sie demzufolge nur als Annäherung betrachten.

Dagegen können wir bei Berechnung der Wahrscheinlichkeit der Reinheit einer gegebenen Kolonie ohne Schaden diese Wahrscheinlichkeit ziemlich niedrig schätzen. Bei Anwesenheit einer bedeutenden Zahl von größeren Kolonien, als die ausgewählte, nehmen wir nach der Tab. 5 die für größere

Tab. 5. Korrekturen (u) zur gegebenen Kolonienanzahlen zwecks Erhaltung der Zahlen der ausgesäten Individuen.

Anzahl der Kolonien	Durchmesser der Kolonien mm						
	0,25	0,50	0,75	1,0	2,0	3,0	4,0
				Durchmesser der Platte 10,0 cm			
25	—	—	—	—	—	—	1
50	—	—	—	—	1	1	2
100	—	—	—	1	2	5	9
250	—	1	2	3	13	33	69
500	1	3	7	13	58	164	506
1 000	3	13	29	54	277	1558	
2 500	20	82	194	377		die Platte	
5 000	80	341	871	1931		ist ganzlich mit Kolonien	
10 000	326	1507	4697			bewachsen	
				Durchmesser der Platte 9,0 cm			
25	—	—	—	—	—	—	1
50	—	—	—	—	1	1	3
100	—	—	—	1	2	6	11
250	—	1	2	4	16	43	95
500	1	4	9	16	74	230	
1 000	4	16	36	63	359		
2 500	24	102	243	490		die Platte	
5 000	99	431	1142	2780		ist ganzlich mit Kolonien	
10 000	407	1959	7046			bewachsen	

Kolonien korrigierte Kolonienanzahl. Die Wahrscheinlichkeit P_R dagegen entnimmt man unmittelbar der Tab. 4, entsprechend dem wirklichen Durchmesser der ausgewählten Kolonie. Z. B.: die ausgewählte Kolonie hat 1 mm Durchmesser, während die Mehrzahl anderer Kolonien einen Durchmesser bis 2 mm aufweist. Die Kolonienanzahl sei 500. In der Tab. 5 finden wir die entsprechende Korrektur gleich 58, daraus findet man die Wahrscheinlichkeit P_R für eine Kolonie mit 1 mm Durchmesser bei 558 Kolonien innerhalb der Grenzen $0{,}9844 < P_R < 0{,}9922$.

Es sei bemerkt (was zwar selbstverständlich ist), daß unsere Berechnungen und Tabellen keine biologischen Faktoren, die die Reinheit der Kolonien beeinflussen können, berücksichtigen. Diese Faktoren können, besonders bei der Analyse der Rohmaterialien, welche Mischungen verschiedener Kleinlebewesen enthalten, sehr merklichen Einfluß haben.

Der Begriff „Individuum" deckt sich nicht immer mit dem Begriff „Zelle" oder aus der einen Zelle gebildeter Verbände (Diplo, Strepto, Tetra usw.). Das „Individuum" im Sinne, in dem das Wort hier gebraucht ist, bedeutet alles, was sich individuell in der Flüssigkeit befindet und eine Kolonie bilden kann. Es können z. B. die verschiedenen Keime, zu Zooglöen verklebt, als einziges Individuum vorkommen und offenbar eine Kolonie ergeben. Es kann gleichfalls die Kolonie als Erscheinung symbiotischer Entwicklung verschiedener Arten (z. B. Azotobacter und Radiobacter) entstanden sein. Es können sich weiter einige Keime in dem Nährboden (und auch in den Kolonien anderer Mikroorganismen) befinden, die kein Wachstum aufweisen.

In bezug darauf glauben wir, daß unsere Tabellen in den Fällen anwendbar sind, wo wir aus der sog. Rohkultur die — praktisch — absolute Reinkultur erhalten wollen. Wie ersichtlich ist, ist die Wahrscheinlichkeit

von 0,9999 leicht zu erhalten, d. h. auf 10 000 abgeimpfte Kolonien wird nur eine nicht rein sein. In den zeitraubenden, technisch schwierigen mikroskopischen Methoden der Reinkulturisolierung ist eine höhere Wahrscheinlichkeit kaum zu erhalten.

Zusammenfassung.

Es wurde empirisch festgestellt, daß bei dem gewöhnlichen Plattenverfahren, die Kolonienverteilung auf den einzelnen Platten regelmäßig gute Übereinstimmung mit Poissons Wahrscheinlichkeitsgesetz aufweist.

Als Konsequenz dieses Gesetzes berechneten wir die Wahrscheinlichkeiten der Entwicklung von Kolonien aus einzelnen Individuen. Die Tab. 4 stellt diese Werte dar für verschiedene Ausgangsdaten, und zwar für gegebene Durchmesser der Platten, Durchmesser und Anzahl der Kolonien.

Die bei der Hauptberechnung angewandten vereinfachten Voraussetzungen, daß die Kolonien in einer Ebene liegen und gleiche Dimensionen haben, bedeuten keine Schwierigkeiten bei der Anwendung der Tabellen in der Laboratoriumspraxis. Die erste Voraussetzung, obwohl sie tatsächlich selten erfüllt ist, sichert uns vor Überschätzung der gesuchten Wahrscheinlichkeit. Um die Korrektur der Wahrscheinlichkeitswerte bei Anwesenheit der größeren Kolonien, als die zur Abimpfung ausgewählte, zu berechnen, haben wir die Tab. 5 bearbeitet, die uns diese Korrekturen für verschiedene Fälle angibt. Nach Addition der Korrekturen zu der Anzahl der Kolonien auf der Platte erhält man die wirkliche Gesamtzahl der ausgesäten Individuen. Bei der Bestimmung der Reinheitswahrscheinlichkeit der Kolonie sind die Korrekturen anwendbar, im Gegensatz dazu sind sie bei der Keimzahlbestimmung mittels der Plattenmethode nur bei Erfüllung der oben besprochenen vereinfachten Voraussetzungen anwendbar.

Literatur.

1. Bortkiewicz, M., Das Gesetz der kleinen Zahlen. Leipzig 1898. — 2. Fisher, R. A., Thornton, H. G., and MacKenzie, W. A., The Ann. of Applied Biol. Vol. 9. 1928. p. 325. — 3. Kellerman, K. F., and McBeth, J. G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. S. 481. — 4. Matuszewski, T., Przemysł Rolny. Bd. 9. 1932. S. 268. — 5. Matuszewski, T., Medyc. Dośw. i Spol. Bd. 18. 1934. H. 5/6. — 6. Maurizio, A. und Staub, W., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 75. 1928. S. 375. — 7. Neyman, J., and Pearson, E. S., Biometrika. Vol. 20 A. 1928. p. 175 a. 263. — 8. Pearson, K., Tables for Statisticians and Biometricians. Part I. 1930. p. 113. — 9. Pearson, K., l. c. 26. — 10. „Student", Biometrika. Bd. 5. 1907. S. 351 u. 364. — 11. Ziegler, N. R., and Halvorson, H. O., Journ. of Bact. Vol. 29. 1935. p. 609.

Nachdruck verboten.

Über das Verhalten einiger molkereitechnisch wichtigen Penicillium-Arten gegenüber verschiedenen organischen Stickstoffquellen.

[Aus der Bakteriologischen Abteilung der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Weihenstephan, Techn. Hochschule München (Abteilungsleiter: Dozent Dr. K. J. Demeter).]

Von **Karl J. Demeter** und **Richard Pfundt.**

In Fortsetzung der Untersuchungen von Moser (3) erschien es uns als eine dankbare Aufgabe, mit einigen der von ihm geprüften Penicillium-Arten auch das Wachstum in Nährlösungen mit wechselnder organischer N-Quelle zu untersuchen[1]). Es bestand die Aussicht, hierbei auch Einblick in für die Käserei wichtige Vorgänge zu erhalten, insbesondere interessierten uns evtl. Gegensätzlichkeiten des als Schädling bekannten Pen. bruneo-violaceum (sog. Braunschimmel) gegenüber den echten Camembert-Schimmeln. Schon seit längerer Zeit erhob sich bei uns die Frage, ob dieser Schimmel nicht dadurch gefördert wird, daß in Käsen, die aus pasteurisierter Milch hergestellt worden sind, auch Albumin vorhanden ist; denn einige Beobachtungen im praktischen Betrieb unserer Anstalt deuteten in die Richtung, daß Camembertkäse aus pasteurisierter Milch anfälliger sind als solche aus Rohmilch. Auch der Frage des Salzeinflusses sollte nachgegangen werden.

Bezüglich der Arbeit von Moser (3) sei hier erwähnt, daß dieser neben den anorganischen N-Quellen als einzige organische N-Quelle Pepton verwendet hat. Die von ihm erhaltenen, für uns wichtigen Resultate sind folgende:

1. Das Penicillium candidum gedeiht nicht in einer Mischlösung von Pepton + Ammonchlorid, jedoch sehr gut mit Ammonchlorid allein. 2. Das Penicillium camemberti dagegen gedeiht in der Mischlösung Pepton + Ammonchlorid besonders gut. 3. Das Penicillium bruneo-violaceum wird in ammonchloridhaltiger Pepton-Lösung gehemmt, in Peptonlösung allein bei neutraler Reaktion dagegen zu üppigem Wachstum veranlaßt, wobei es diesbezüglich die echten Camembert-Schimmel übertrifft.

Über die Verwendung von Ammonchlorid zur Bekämpfung des Pen. br.-viol. auf Camembert-Käsen laufen zur Zeit praktische Versuche in unserem Anstaltsbetrieb, über die später anderweitig berichtet wird.

Die zu den Untersuchungen verwendeten Camembert-Edelschimmel, Penicillium candidum und Penicillium camemberti, waren dieselben, die s. Zt. Moser (3) zur Verfügung gestanden hatten. Bei den Versuchen mit Pen. br.-viol.-Stämmen wurde später ein neu vom Bakteriol. Institut der Preußischen Forschungsanstalt für Milchwirtschaft bezogener Stamm verwendet.

Arbeitsmethoden.

Wegen Reinkultur der Schimmelpilze und der Art und Weise der Beimpfung der Kulturkölbchen mit Sporenaufschwemmungen (50 ccm Nährflüssigkeit in 100 ccm fassenden Weithals-Erlenmeyer-Kölbchen) sei auf die Arbeit von Moser (3) ver-

1) Für seine freundliche Mitarbeit bei Beginn dieser Untersuchungen sei Herrn Dr. H. Moser der gebührende Dank ausgesprochen.

Alle Versuche wurden mindestens im Duplikat durchgeführt; die Zahlen in den Tabellen stellen den erhaltenen Mittelwert in Milligramm dar.

I. Allgemeine Methoden.

a) Erntegewicht.

Das Pilzmyzel wurde durch ein gewogenes Filter von der Nährflüssigkeit abfiltriert, das Filtrat in einem 100-ccm-Meßkolben aufgefangen, hierauf so lange mit destilliertem Wasser nachgewaschen, bis sich 100 ccm Flüssigkeit im Kölbchen befanden. Der Rückstand samt Filter wurde 20 Std. bei 45—50° C und 2½ Std. bei 100° C getrocknet und dann gewogen.

Für die Bestimmung des Erntegewichts auf Cystin-Nährböden mußte ein besonderes Verfahren angewendet werden, da es nicht möglich war, eine vollständige Lösung des Cystins zu erzielen: Im sauren Medium ist Cystin ganz unlöslich, im alkalischen trifft dies für $Mg_3 (PO_4)_2$ zu. Es wurde deshalb p_H 7,76 gewählt. Bei dieser p_H-Stufe ist das Cystin teilweise gelöst. Die Bestimmung der Erntegewichte wurde nun so vorgenommen, daß der unlösliche Rückstand in mehreren nichtbeimpften Kölbchen bestimmt und vom jeweils gefundenen Erntegewicht + Rückstand abgezogen wurde. Die in der Tabelle 1 angegebenen Werte dürften um eine Kleinigkeit zu niedrig sein, weil wohl anzunehmen ist, daß auch von dem Bodensatz durch die Pilztätigkeit etwas gelöst wurde.

Die in den Tabellen angegebenen Erntegewichte sind aus 50 ccm Nährlösung erhalten worden. Ebenso beziehen sich die Angaben über die einzelnen N-Anteile auf 50 ccm Nährlösung.

b) Die Wasserstoffionenkonzentration.

Zu ihrer Ermittlung diente ein Teil des unverdünnten Filtrats. Die Bestimmung erfolgte mit dem Elektro-Jonometer.

c) Volutinnachweis.

Ein Flöckchen Pilzmyzel wurde auf dem Objektträger eingetrocknet, in der Flamme fixiert und mit älterer Methylenblau- oder Loefflerblaulösung gefärbt. Nach 3 Min. wurde abgespült und auf das noch nasse Präparat ein Deckglas gelegt, hierauf von der Seite ein Tropfen 1proz. Schwefelsäure zufließen gelassen. Die Säure entfärbt alles mit Ausnahme der Volutinkörperchen.

In der Arbeit von Moser (3) wurde festgestellt, daß der Volutinnachweis als Differenzierungsmittel zwischen Pen. cand. und dem Pen. cam. dienen kann (P. cand. —, P. cam. +). Es sollte diese Beobachtung auf verschiedenen Nährböden weiter verfolgt werden.

Die erhaltenen Resultate mögen hier gleich vorweggenommen werden: Auf allen im folgenden angegebenen Nährböden war das Ergebnis in Bestätigung der Moserschen Befunde folgendes:

Volutin fand sich in den untersuchten Kulturen nie bei Pen. cand., regelmäßig bei Pen. cam. und meist auch bei Pen. br.-viol.

II. Besondere Methoden zum Nachweis des Kaseinabbaus.

a) Kaseinbestimmung.

20 ccm der wie oben beschriebenen 1 : 1 verdünnten Nährflüssigkeit (10 ccm der ursprünglichen Nährflüssigkeit) pipettierte man in ein 50-ccm-Becherglas und gab zum Zwecke der Kaseinfällung unter ständigem Umrühren möglichst langsam ca. 3 ccm n/10 Essigsäure zu. Das Kaseingerinnsel wurde auf einem Filter (589 Blauband oder 602 hart von Schleicher & Schüll) gesammelt und mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen. Das Filter mit Inhalt wurde nach Kjeldahl verbrannt und der Stickstoff bestimmt.

b) Peptonbestimmung.

Das Filtrat der Kaseinfällung wurde mit 2 ccm konz. Schwefelsäure angesäuert und zur Ausfällung des Peptons mit 20 ccm 10proz. Phosphor-Wolframsäure versetzt. Nach Stehen über Nacht sammelten wir den Niederschlag auf einem harten Filter, wuschen mit 30proz. Schwefelsäure nach und verbrannten das Filter mit Inhalt nach Kjeldahl.

c) Bestimmung des Rest-Stickstoffs im engeren Sinne.

Wir gaben zu den im 100-ccm-Meßkolben bleibenden 80 ccm der 1 : 1 verdünnten Nährlösung 4 ccm 20proz. Trichlor-Essigsäure sowie 4 ccm 10proz. Natrium-Wolframlösung und füllten auf 100 ccm auf. Nach Filtration durch ein hartes Faltenfilter wurden 25 ccm der Lösung (10 ccm der ursprünglichen Nährflüssigkeit) nach Kjeldahl verbrannt und der Stickstoff bestimmt.

d) Bestimmung des Ammoniaks und der durch Erhitzen mit Natronlauge Ammoniak abspaltenden N-Verbindungen.

In weiteren 25 ccm des bei c) erhaltenen Filtrates wurde durch Destillation mit Natronlauge der Stickstoff, soweit er in Form von Ammonsalzen oder von durch Natronlauge zersetzbaren Aminoverbindungen vorlag, bestimmt.

Die Bestimmung des Ammoniakstickstoffs allein nach Folin durch Destillation im Luftstrom erwies sich wegen des starken Schäumens als kaum durchführbar.

Die Methoden der N-Differenzierung sind im wesentlichen der Arbeit von Kieferle und Gloetzl (1) entnommen.

III. Zusammensetzung der Nährlösungen.

1 Liter enthielt

0,25	Mol.	Glukose
0,02	,,	prim. oder sek. Kaliumphosphat
0,005	,,	Magnesiumsulfat
0,05	,,	der Stickstoffverbindungen

(Aminosäuren). Bei den Versuchen mit Pepton, Albumin und Kasein als N-Quelle ist der Prozentgehalt (d. h. g/100 ccm Lösung) angegeben. Abweichungen oder Zusätze sind besonders vermerkt.

Ergebnisse.

Als Maßstab für die Brauchbarkeit eines Stoffes durch die in Frage stehenden Penicillien diente uns, wie schon aus der Methodik zu ersehen ist, das jeweilige Erntegewicht nach gewissen Zeitabständen. Wo es möglich war, wurde jeder Stoff sowohl in saurer wie in fast neutraler Ausgangslösung geprüft. Gleichzeitig wurde auch eine p_H-Bestimmung durchgeführt.

I. Aminosäuren (vgl. Tab. 1).

a) Glykokoll.

Die echten Camembert-Schimmel zeigen in Glykokoll-Lösung bei jeder Reaktion ein sehr gutes Wachstum, insbesondere Pen. cam., während Pen. br.-viol. nach 11 bzw. 15 Tagen nur ungefähr das halbe Erntegewicht erreicht. Im Vergleich zu allen übrigen Aminosäuren erreichen die echten Camembert-Schimmel in neutraler Glykokoll-Lösung einen Höchstbetrag, der bei den anderen Aminosäuren nur noch von den Kulturen in saurer Lösung übertroffen wird.

b) Alanin.

Das Wachstum der beiden Edelschimmel in Alaninlösung saurer und neutraler Reaktion ist günstig, Pen. br.-viol. erreicht diesen Stand erst einige Tage später (in 15 anstatt 12 Tagen). Bemerkenswert ist hier,

Tabelle 1.

Wachstum von Pen. cand., Pen. cam. und Pen. br.-viol. auf Nährböden mit verschiedenen Aminosäuren als N-Quelle.

Erntegewicht in mg (p_H in Klammern).

Tag	Glykokoll, p_H 4,16			Glykokoll, p_H 6,52			Alanin, p_H 4,37			Alanin, p_H 5,82			Leucin, p_H 4,61		
	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.
3.				38 (6,8)	16(6,8)								8 (4,4)	20(4,2)	
4.							116 (3,7)	58(4,2)		150 (5,4)	145(5,5)				
5.	8 (4,4)	44(6.0)	6 (4,3)	128 (6,7)	76(7,0)	12 (6.7)							68 (3,8)	63(3,9)	8 (4,9)
6.							267 (3,7)	142(5,7)		183 (4,9)	192(5,5)				
7.	21 (5,4)	106(6,2)	12 (4,7)	353 (4,3)	278(5,7)	71 (6,6)			39 (4,0)				185 (4,5)	142(4,8)	56 (4,0)
8.							488 (3,0)	421(4,7)		296 (3,9)	309(5,2)	87 (5,6)			
9.	225 (3,4)	366(6,3)	76 (4,4)	612 (3,0)	511(5,3)	267 (4.9)			140 (3,8)				394 (3,3)	343(3,4)	113 (3,6)
10.							404 (3,3)	518(5,2)		457 (3,3)	518(5,2)	159 (4,6)			
11.				671 (3,1)	623(4,3)	324 (4,4)							553 (2,4)	342(3,1)	272 (3,1)
12.							476 (3,8)					254 (4,2)			
13.	487 (4,5)	668(2,9)	230 (3,6)			454 (4,2)			357 (2,9)	476 (3,8)	494(5,0)				315 (3,5)
14.												453 (3,2)			
15.	587 (2,5)	697(2,8)	309 (3,6)						426 (2,3)			491 (3,4)			

Tag	Leucin, p_H 6,37			Glutaminsäure, p_H 3,91			Glutaminsäure, p_H 6,43		
	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.
3.				20 (4,1)	23 (4,1)				
4.	34 (6,0)	49 (6,3)					36 (6,5)	35 (6,5)	
5.				193 (4,6)	184 (4,7)	12 (4,0)			
6.	98 (4,3)	144 (6,0)	27 (6,1)				173 (6,7)	112 (7,0)	21 (6,5)
7.				424 (4,3)	447 (5,4)	34 (4,0)			
8.	134 (4,0)	252 (5,6)	90 (5,2)				281 (6,0)	235 (6,8)	69 (6,4)
9.				694 (4,5)	669 (5,7)	151 (4,0)			
10.	264 (4,1)	393 (5,6)	325 (3,7)				475 (4,7)	311 (6,5)	131 (6,2)
11.				715 (3,6)	791 (5,8)	295 (3,8)			
12.	490 (4,4)	510 (5,4)	603 (3,3)						
13.						421 (3,6)	564 (4,1)	456 (6,9)	215 (5,3)
14.			578 (3,4)						
15.									348 (5,4)

Tag	Cystin, p_H 7,76		
	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.
19.	130	76	2
22.	264 (3,6)	293 (3,5)	91 (5,2)
26.	341 (3,1)	361 (3,4)	101 (4,5)
29.	463 (3,4)	396 (3,5)	111 (4,3)
33.	523 (3,1)	429 (3,3)	112 (4,4)

daß im Vergleich zu allen übrigen Aminosäuren das Anfangswachstum der beiden echten Camembert-Schimmel während der ersten 8 Tage ungemein gefördert ist, worauf dann nur mehr sehr langsamer Zuwachs erfolgt.

c) Leucin.

Pen. cand. und Pen. cam. verhalten sich hier ähnlich wie in Alaninlösung, während Pen. br.-viol. sich ganz auffallend gut in der neutralen Leucinlösung entwickelt und ein nie wieder beobachtetes starkes Wachstum erreicht. Da sowohl im Kasein wie im Albumin das Leucin zu hohem Prozentsatz vertreten ist, läßt sich annehmen, daß bei schwindender Azidität und steigendem Eiweißabbau das Pen. br.-viol im Vergleich zu den Edelschimmeln günstigere Bedingungen finden kann.

d) Glutaminsäure.

Die Glutaminsäure ist in saurer Lösung weitaus der günstigste Aminosäurennährboden für die beiden Edelschimmel; jedoch ist auch das Wachstum bei alkalischer Ausgangsreaktion nicht schlecht. Weiterhin ist bemerkenswert, daß hier auch das Pen. br.-viol. im Gegensatz

Tabelle 2.
Wachstum von Pen. cand., Pen. cam. und Pen. br.-viol. auf Nährböden mit Pepton, Albumin und Kasein als N-Quelle. Erntegewicht in mg (p_H in Klammern).

Tag	0,3% Pepton, p_H 4,94			0,3% Pepton, p_H 7,0			0,6% Albumin, p_H 3,45			0,6% Albumin, p_H 5,80			0,6% Kasein, p_H 5,87		
	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.	P. cand.	P. cam.	P. br.-v.
3.				15 (7,0)	47(6,2)	23 (6,9)									
4.	2 (4,7)	5(5,0)	6 (4,9)		74(4,3)		25 (4,3)	36(3,7)		21 (6,3)	42(6,2)				
5.				33 (6,3)	85(4,4)	59 (4,7)							12 (6,1)	34(5,9)	2 (5,9)
6.	18 (5,3)	13(5,0)	13 (4,8)							74 (5,7)	92(6,0)				
7.				28 (6,6)	107(3,6)	36 (4,8)	121 (3,2)	103(3,3)	bleibt vollständig aus				96 (6,0)	115(5,9)	11 (5,8)
8.	78 (5,0)	42(5,3)	27 (4,8)							115 (5,4)	115(5,6)				
9.				98 (3,7)	150(3,3)	132 (2,9)							370 (5,5)	441(5,4)	26 (5,7)
10.	191 (4,0)	130(4,6)	145 (3,7)				232 (3,4)	220(3,2)		170 (3,7)	120(5,1)				
11.				111 (3,6)		227 (2,1)							569 (4,8)	592(4,9)	13 (5,4)
12.	262 (3,5)	292(3,3)	153 (3,7)				258 (3,2)	222(3,1)		170 (3,8)	206(5,1)	88 (4,8)			
13.													683 (4,4)	694(4,8)	
14.							315 (2,9)	293(2,9)							
15.															
16.												122 (5,0)			
17.															
18.												225 (5,4)			

zu den Ergebnissen mit allen übrigen Aminosäuren und auch zu den früheren Befunden von Moser (3) in saurer Lösung besser gedeiht als in neutraler, ohne daß jedoch irgendwie die Erntegewichte der beiden Edelschimmel erreicht würden (kaum die Hälfte).

c) Cystin.

Das Wachstum setzte mit einer solchen Verzögerung ein, wie es noch nicht beobachtet wurde, insbesondere bei Pen. br.-viol. Es dauerte 33 Tage, bis durchschnittliche Erntegewichte erreicht wurden, die bei den anderen Aminosäuren schon nach 10—12 Tagen auftraten. Allerdings dürfte der im alkalischen Bereich liegenden Reaktion auch ein gewisser Einfluß zuzuerkennen sein. Bei den am 29. Tage untersuchten Proben zeigten die mit Pen. cand. beimpften Kölbchen einen sehr typischen nuß- bis haselnußartigen Geruch, die mit Pen. cam. besäten einen mehr schimmeligen Geruch, während die Kulturen des Pen. br.-viol. wie Maggis Suppenwürze rochen.

II. Pepton (vgl. Tab. 2).

Es ist interessant, daß — wie schon Moser (3) gefunden hat — in 0,3 proz. Peptonlösung[1]) insbesondere das Pen. br.-viol. sehr gut gedeiht und bei neutraler Reaktion die beiden echten Camembert-Schimmel bezüglich des Erntegewichts endgültig überflügelt.

Bei dieser Untersuchung wurde auch der gleichzeitige Einfluß des Salzgehaltes geprüft (vgl. Tab. 3). Da man annehmen darf, daß der Salzgehalt

Tab. 3. Wachstum von Pen. cand., Pen. cam. und Pen. br.-viol. auf Pepton-Nährlösung mit steigendem NaCl-Zusatz.
Nährlösung: 6 g Pepton Witte, 0,02 mol Kaliumphosphat, 0,005 mol Magnesiumphosphat/L.
Erntegewicht in mg (p_H in Klammern).

% NaCl	Anfangs-p_H	Pen. candidum	Pen. cam.	Pen. br.-viol.
			9. Tag	
7,42	6,0	einige linsengroße Inseln, (6,0)	einige linsengroße Inseln, (6,1)	einige linsengroße Inseln, (5,9)
10,39	6,0	— (5,8)	einige stecknadelkopfgroße Inseln, (5,9)	—
14,54	5,9	—	—	—
20,36	5,7	—	—	—
			18. Tag	
7,42	6,0	Randmyzel, Konidien, (6,9)	bohnengroße Inseln Oberfläche fast bedeckt, Konidien, (6,9)	mehrere pfenniggroße Inseln, keine Konidien, (7,6)
10,39	6,0	10 linsengroße Inseln, (6,0)	linsengroße Inseln, Oberfläche größtenteils bedeckt, Konidien, (6,5)	mehrere bohnengroße Inseln, keine Konidien, (6,3)
14,54	5,9	subm. Myzel, stark gekörnter Inhalt (5,9)	subm. Myzel, stark gekörnter Inhalt, (5,9)	subm. Myzel, Inhalt stark gekörnt, (6,0)
20,36	5,7	—	—	—

[1]) In höherer Konzentration (2%) wirkt das Pepton bei Pen. br.-viol. umgekehrt, worüber im Zusammenhang mit einer anderen Fragestellung zu einem späteren Zeitpunkt berichtet wird.

der Rinde mindestens den doppelten Betrag ausmacht, als der für das Schimmelwachstum optimale Durchschnittsgehalt des Käses beträgt [3,2 bis 3,6% nach Kieferle und Sonnleitner (2)], stellten wir die Untersuchungen bei 7,4% beginnend an. Es zeigte sich infolge des Salzzusatzes bei allen Schimmeln ein stark behindertes Wachstum. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Schimmelarten war nicht festzustellen.

III. Albumin (vgl. Tab. 2).

Bei den Edelschimmeln findet sich im Vergleich zum Kasein ein schwächeres Wachstum; Pen. br.-viol. gedeiht in der sauren Lösung überhaupt nicht und in der neutralen Lösung ist sein Wachstum ebenso dürftig wie beim Kasein.

Tab. 4. Wachstum von Pen. cand., Pen. cam. und Pen. br.-viol. auf Kasein-Nährlösungen mit steigendem NaCl-Zusatz.

Nährlösung: 6 g Kasein, 0,02 mol Kaliumphosphat, 0,005 mol Magnesiumsulfat/L.

Erntegewicht in mg (pH in Klammern).

% NaCl	Anfangs-pH	Pen. candidum		Pen. cam.		Pen. brunoo-viol.	
		9. Tag	18. Tag	9. Tag	18. Tag	9. Tag	18. Tag
0,08	6,0	7 (6,1)	39 (6,1)	6 (6,0)	17 (5,9)	5 (5,8)	17 (5,7)
0,17	5,9	10 (5,9)	45 (6,1)	8 (5,9)	23 (5,9)	6 (5,7)	25 (5,3)
0,33	5,9	16 (5,8)	54 (6,5)	12 (5,8)	44 (6,0)	9 (5,8)	25 (5,6)
0,66	5,7	17 (6,0)	65 (6,5)	18 (5,6)	69 (6,5)	15 (5,6)	42 (6,2)
1,32	5,6	11 (5,7)	72 (6,7)	32 (5,4)	74 (6,7)	14 (5,4)	51 (5,6)
2,65	5,3	9 (5,5)	67 (6,4)	26 (5,3)	79 (6,6)	8 (5,1)	49 (6,3)
5,30	5,2	13 (5,3)	52 (6,0)	13 (5,2)	56 (6,5)	10 (5,2)	25 (5,3)
7,42	5,8	—	—		wenig schleimiges subm. Myzel	einige Flöckchen Myzel	wenig subm. Myzel
10,39	5,7	—	—				sehr wenig subm. Myzel

IV. Kasein (vgl. Tab. 2 und 4).

Mit Kasein ist, wie bei den günstig wirkenden Aminosäuren, ein sehr gutes Wachstum der Edelschimmel festzustellen, während Pen. br.-viol. (Weihenstephaner Stamm) nur sehr kärglich gedeiht (Tab. 2). Anscheinend fehlt es diesem Pilz an den notwendigen Enzymen, echtes Protein aufzuspalten und als N-Quelle zu benutzen.

Bei den Versuchen mit Kochsalzzusatz (Tab. 4), die in Angleichung an die natürlichen Bedingungen ohne Glukosezusatz zum Kasein-Nährboden durchgeführt wurden, wurden weniger günstige Ergebnisse als wie in der mit Salz versetzten Peptonlösung erhalten. Pen. cand. und br.-viol. (Kieler Stamm) erreichten ihren Höchstbetrag bereits bei 1,3%, Pen. cam. bei 2,6% Kochsalzgehalt. Bei 7,4% zeigte Pen. cand. überhaupt kein Wachstum mehr, Pen. cam. nach 18 Tagen nur wenig schleimiges, submerses Myzel, während letztgenannte Erscheinung bei Pen. br.-viol. erst bei 10,4% Kochsalzgabe auftrat. Es scheint also im Kaseinmedium das Pen. br.-viol. am salzresistentesten zu sein. Dies würde mit der in der Praxis gemachten Beobachtung übereinstimmen, wonach dieser Schimmel gern auf zu stark gesalzenen Käsen auftritt. Wurde des weiteren von den mit höheren Salzgaben versehenen Kölbchen, die keinerlei

Wachstum mehr erkennen ließen, auf Nährbieragar abgeimpft, so ergab sich nur mehr bei Pen. br.-viol. ein Auskeimen der aus der 14,5 proz. Salzlösung abgeimpften Sporen.

Art des Kaseinabbaus (vgl. Tab. 5).

Auffallend ist von vornherein, daß bei diesen Versuchen der Pen. br.-viol.-Stamm sowohl bezüglich des Wachstums als auch der Tiefe des Abbaus die beiden Edelschimmel um ein Bedeutendes übertrifft. Hier stand der Kieler Stamm zur Untersuchung, während die vorerwähnten Untersuchungen ohne Salzzusatz noch mit dem Weihenstephaner Stamm durchgeführt worden waren.

Tab. 5. Wachstum von Pen. cand., Pen. cam. und Pen. br.-viol. auf Kaseinnährböden von verschiedenem Anfangs-p_H. Verfolg des Abbaues von Kasein.

Nährlösung	Tag der Untersuchung	Anfangs-p_H	Erntegew. mg	End-p_H	Kasein-N	Pepton-N	Rest-N	NH_3-N
					in % des Gesamt-N			
			Penicillium candidum					
1. 6 g Kasein, $^1/_{50}$ mol KH_2PO_4, $^1/_{200}$ mol $MgSO_4$-$7 H_2O$ / 1 Ltr.	9.	4,9	7	5,48	50,7	44,4	5,0	5,6
	18.	4,9	51	6,74	8,7	53,3	38,0	27,0
2. wie 1.	9.	6,4	11	6,90	76,9	21,2	2,0	2,0
	18.	6,4	25	7,13	14,8	63,4	21,8	10,5
3. 12 g Kasein, sonst wie 1.	9.	6,1	15	6,37	70,4	24,5	5,2	2,6
	18.	6,1	82	6,92	10,8	55,5	33,6	18,4
			Penicillium camemberti					
1. 6 g Kasein, $^1/_{50}$ mol KH_2PO_4, $^1/_{200}$ mol $MgSO_4$-$7 H_2O$ / 1 Ltr.	9.	4,9	11	5,45	52,0	40,0	8,0	6,4
	18.	4,9	36	6,45	14,2	57,9	27,9	15,7
2. wie 1.	9.	6,4	9	6,85	75,0	22,1	2,9	2,9
	18.	6,4	13	7,15	26,1	58,6	15,2	7,9
3. 12 g Kasein, sonst wie 1.	9.	6,1	18	6,43	60,4	33,8	5,9	3,7
	18.	6,1	41	7,07	14,3	59,0	26,8	12,8
			Penicillium bruneo-violaceum					
1. 6 g Kasein, $^1/_{50}$ mol KH_2PO_4, $^1/_{200}$ mol $MgSO_4$-$7 H_2O$ / 1 Ltr.	9.	4,9	20	5,34	32,7	57,0	10,3	5,2
	18.	4,9	65	6,71	0	50,2	49,8	28,8
2. wie 1.	9.	6,4	14	6,99	22,6	66,1	11,3	6,0
	18.	6,4	57	7,22	1,8	54,3	44,0	26,4
3. 12 g Kasein, sonst wie 1.	9.	6,1	11	6,21	59,7	36,4	3,8	2,1
	18.	6,1	98	7,30	3,8	51,0	45,2	26,0

Die beiden Edelschimmel zeigen im großen und ganzen ein gleichartiges Verhalten mit der Tendenz, daß Pen. cand. immer etwas mehr Rest-

stickstoff bzw. Ammoniak bildet. Der Kaseinabbau geht also letzten Endes etwas mehr in die Tiefe.

Der Abbau ist bei p_H 6,1—6,4 etwas schwächer als bei p_H 4,9. Pen. br.-viol. baut das Kasein fast vollständig ab, ziemlich unabhängig von den im Versuch angewandten Wasserstoffionen-Konzentrationen, und erzeugt dabei ganz beträchtliche Mengen an Reststickstoff bzw. Ammoniak.

Diskussion und Zusammenfassung.

Vom käsereitechnischen Standpunkt aus betrachtet sind folgende Feststellungen von Interesse.

Mit Glykokoll, das im Kasein und Albumin allerdings in sehr geringer Menge vorkommt, gedeihen die Edelschimmel bei jeder geprüften Reaktion besser als der Braunschimmel.

Alanin ist im Kuhmilchalbumin etwa doppelt so stark vertreten als im Kuhkasein. Sein Vorhandensein im Käse fördert nach unseren Ergebnissen das Wachstum der Edelschimmel besser als das des Pen. br.-viol. Somit ergibt sich daraus ein Anhaltspunkt dafür, daß Käse aus pasteurisierter Milch infolge des auf Grund des Albumineinschlusses höheren Alaningehalts günstigere Wachstumsbedingungen für den Braunschimmel bieten sollten als Käse aus roher Milch.

Leucin ist im Albumin etwas reichlicher enthalten als im Kasein und fördert das Wachstum des Braunschimmels mit steigendem p_H im Vergleich zu den Edelschimmeln wesentlich stärker. Trotzdem kann in der Praxis von einer Förderung desselben durch Albumineinschluß im Käse nicht die Rede sein, da die Albuminmenge im Vergleich zur Kaseinmenge verschwindend gering ist.

Da der Anteil der Glutaminsäure an der Zusammensetzung des Kaseins im Vergleich zu allen übrigen Aminosäuren am höchsten ist, darf angenommen werden, daß durch das Auftreten der Glutaminsäure beim Kaseinabbau auch das Pen. br.-viol. eine gewisse Förderung erfährt, und zwar nicht erst im späten, sondern schon im frühen Reifestadium des Käses, solange noch keine alkalische Reaktion herrscht.

Cystin kommt im Kasein nur in Spuren vor, im Albumin zu etwa 2%. Würde das Pen. br.-viol., wie eingangs angedeutet wurde, deshalb auf Käsen aus pasteurisierter Milch besser gedeihen, weil durch die Hitzegerinnung gewisse Mengen Albumin mit in die Käsemasse eingeschlossen und bei der Reifung mit abgebaut werden, so hätte sich eine Förderung des Pen. br.-viol. durch solche Aminosäuren zeigen müssen, die wohl im Albumin, aber nicht im Kasein vorkommen. Cystin fördert jedenfalls das Wachstum von Pen. br.-viol. nicht, im Gegenteil, der Braunschimmel gedeiht damit verhältnismäßig schlechter als mit den anderen Aminosäuren.

Pepton dürfte von seinem ersten Auftreten an in der Käserinde eine Förderung des Braunschimmels zur Folge haben, mindestens aber sein Wachstum ebenso günstig beeinflussen wie das der Edelschimmel. Diese Tatsache würde gut mit den Erfahrungen der Praxis übereinstimmen, wonach das erste Auftreten des Pen. br.-viol. bereits in den frühen Reifestadien des Camembert-Käses zu bemerken ist.

Das genuine Albumin ist für den Braunschimmel ein schlechter Nährboden, für die Edelschimmel nicht in diesem Maße. Eine Förderung

des erstgenannten, durch Einschluß von Albumin in den Käsestoff infolge Pasteurisierung der Käsereimilch, kommt also wiederum nicht in Frage.

Kasein wird von den Pen. br.-viol.-Stämmen nicht einheitlich abgebaut. Der Weihenstephaner Stamm zeigte damit schlechtes Wachstum, der Kieler sehr gutes. Die Edelschimmel gedeihen damit recht gut, nur ist der Abbau in der Tiefe nicht so stark wie beim Braunschimmel (Kieler Stamm).

Durch Zusatz von Salz zu Kasein-Nährböden wird der Braunschimmel bei Konzentrationen von 5—15% weniger gehemmt als die Edelschimmel, was für die Frage seiner Bekämpfung in der Praxis besonders wichtig ist (Vorsicht beim Salzen!).

Schriftenverzeichnis.

1. Kieferle und Gloetzl, Milchw. Forsch. Bd. 11. 1931. S. 62—117. — 2. Kieferle und Sonnleitner, Milchw. Forsch. Bd. 14. 1932. S. 43—76. — 3. Moser, Beiträge zur Physiologie einiger Penicillium-Arten. Diss. Techn. Hochschule München 1933.

Nachdruck verboten.

Zitronensäureanhäufungen in Kulturen des Aspergillus niger in Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration im Nährboden und in Zuckerlösungen.

[Aus dem biochemischen Laboratorium des Forschungsinstituts der Lebensmittelchemie in Moskau, U.d.S.S., Leiter Prof. W. S. Butkewitsch.]

Von S. A. **Barinowa**-Moskau.

In den letzten zwei Jahrzehnten widmen viele Forscher ihre Aufmerksamkeit der Bildung der Zitronensäure in Schimmelpilzkulturen. Dank diesen Arbeiten kann man heute die Frage der Gewinnung der Zitronensäure durch Gärung in manchen Ländern als gelöst betrachten.

Wir wissen nur wenig von den im Auslande angewandten Verfahren zur Zitronensäuregewinnung mit Hilfe von Schimmelpilzen. Die Resultate der zahlreichen Untersuchungen, die in Laboratorien mit verschiedenen Stämmen der Schimmelpilze und unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden, können nur schwerlich verallgemeinert werden und dürfen nicht, ohne entsprechende Nachprüfung, auf andere Stämme übertragen werden.

Unsere Untersuchungen des Jahres 1932 (1) liefern ein ausreichendes Material, um ein Schema der Gewinnung der Zitronensäure mit Hilfe des Aspergillus niger aufstellen zu können. Jedoch schöpfen diese Angaben, wie damals schon erwähnt, noch nicht alle Fragen aus, die mit der Ausarbeitung des zweckmäßigsten Verfahrens der Gewinnung der Zitronensäure verbunden sind.

Bei den in vorliegender Arbeit beschriebenen Versuchen stellten wir uns zum Ziel, die Frage nach dem Einfluß der Zuckerkonzentration im Nährboden und in den Zuckerlösungen auf die Zitronensäureanhäufung in den Aspergillus niger-Kulturen zu lösen.

Aspergillus niger kann Zitronensäure anhäufen, sowohl im Nährboden, auf dem er aufgezogen wurde, als auch in der reinen Zucker-

Tabelle 1.

Analyse der Zuckerlösung	1			
Wachstumsdauer in Std.	45	53	56	69
Zuckerkonzentration im Nahrboden in Proz.	10	5	3	3
Gesamtaziditat 10 ccm in ccm 0,1 n NaOH	108,34	104,91	80,14	79,06
Zitronensäure in g	6,75	6,23	5,09	4,92
Glukonsäure in g	0,456	0,302	0,321	0,309
Oxalsäure in g	0,0	0,0	0,0	0,0
Zuckerrest in g	4,09	3,43	5,36	5,63
Ausbeute an Zitronensaure in bezug auf den verbrauchten Zucker in %	61,8	53,8	51,9	52,5

lösung, die unter die präliminar gezogene Pilzdecke, die sog. „fertige Pilzdecke", gebracht wird. Verschiedene Forscher haben zwecks Aufziehen der Pilzdecken, unter welche später reine Zuckerlösungen gebracht werden, verschiedene Nährböden angewandt, die verschiedene Mengen Zucker enthielten (1—10). In den von ihnen angewandten Nährlösungen war Zucker in Menge von 3—20% vorhanden.

Den ersten Versuch stellten wir an zur Feststellung der optimalen Zuckerkonzentration in der Nährlösung, die zum Aufziehen der Pilzdecke verwendet wird.

1. Konzentration des Zuckers im Nährboden Nr. 1.

Bei diesem Versuch untersuchten wir Nährböden, die 10, 5 und 3% Zucker enthielten. Wir urteilten über die Anwendbarkeit des einen oder des anderen Nährbodens nach der Fähigkeit der auf diesen gezogenen Decken, Zitronensäure auf Zuckerlösungen zu bilden.

Die Versuche wurden in 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben ausgeführt; in die Kolben wurde je 120 ccm der Nahrlösung gegossen; die Mächtigkeit der Flüssigkeitsschicht ist dabei 2,5 cm und die Oberfläche 54 qcm. Nährboden und Zuckerlösung wurden immer zweimal im Kochschen Apparat sterilisiert.

Bei der Analyse der gegorenen Lösungen wurde die Gesamtazidität durch Titrieren von 10 ccm des Mediums mit 0,1 n Alkali mit Phenolphthalein bestimmt, der zurückgebliebene Zucker — nach Bertrand, die Oxalsäure — durch Fällung als Kalziumsalz und durch Titrieren mit Permanganat, die Zitronen- und die Glukonsäure nach Butkowitsch (11) und das Gewicht der Pilzdecke — nach Trocknung bei 80°.

Die in den Tabellen angeführten Daten sind das Mittel von 3—4 Parallelkulturen.

Beim Versuch Nr. 1 wurden Nährböden folgender Zusammensetzung angewandt:

NH_4NO_3	0,3%	$FeCl_3$	0,0029%
KH_2PO_4	0,066%	$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,0044%
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,033%	Zucker	3, 5 u. 10%

Alle Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Stamm 1a des Aspergillus niger durchgeführt.

Die Pilzdecken wurden 45—69 Std. bei der Temperatur von 30° auf Nährlösungen oben angegebener Zusammensetzung gezogen. Der Nährboden wurde danach abgegossen und durch 100 ccm einer 15proz. Zuckerlösung ersetzt, auf welcher die Decken 6 Tage bei 25° gelassen wurden. Nach Ablauf dieser Frist wurde die erste Zuckerlösung abgegossen und durch die zweite ersetzt, die zweite schließlich durch die dritte.

Tabelle 1.

2				3			
45	53	56	69	45	53	56	69
10	5	3	3	10	5	3	3
102,84	122,4	114,77	107,0	89,34	84,47	93,37	99,24
7,07	7,57	7,44	7,08	5,90	5,53	6,59	6,21
0,985	2,003	0,763	0,475	0,505	0,693	0,509	0,578
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,36	5,47	6,43	6,05	7,38	6,85	6,30	5,97
73,2	79,4	83,1	72,4	76,4	67,8	71,3	72,9

Der Pilz entwickelte sich um so langsamer, je geringer die Zuckerkonzentration im Nährboden war, daher wurden die Decken auf Nährböden, die 5 und 3% Zucker enthielten, länger stehengelassen, als auf jenen mit 10% Zucker.

Tabelle 2.

Dauer des Wachsens der Pilzdecke in Std.	45	53	56	69
Zuckerkonzentration im Nährboden in %	10	5	3	3
Menge des Zuckers im Nährboden in g	12	6	3,6	3,6
Gewicht der Pilzdecke vor der Übertragung auf die Zuckerlösung in g . .	1,034	0,959	0,444	0,814
Gewicht der Pilzdecke am Ende des Versuches in g	2,837	2,451	2,174	2,688
Zitronensäure in drei Zuckerlösungen in g	19,72	19,33	18,66	18,59

Beim Analysieren der Zuckerlösungen wurde gefunden (s. Tab. 1 und 2), daß die auf Nährböden mit 10 und 5% Zucker gezogenen Pilzdecken eine fast gleiche Menge Zitronensäure bilden. Pilzdecken, welche auf Nährböden mit 3% Zucker aufgezogen wurden, bilden in der ersten Zuckerlösung weniger Zitronensäure als jene, die auf 10 und 5% Zucker enthaltenden Nährböden aufgewachsen waren. In der zweiten Zuckerlösung ist die Menge der Zitronensäure unter allen Pilzdecken ungefähr gleich. Auf der dritten Zuckerlösung häuft die auf dem Nährboden mit 3% Zucker aufgewachsene Pilzdecke sogar mehr Zitronensäure an als die Decken, die auf den zwei anderen Nährböden aufgezogen wurden. Wenn man den Verbrauch des Zuckers auf den Nährböden in Rücksicht zieht, kann man daher den Zuckergehalt von 3—5% als die vorteilhafteste Konzentration des Zuckers im Nährboden betrachten.

Die Aktivität der Pilzdecke wurde auf dem Nährboden mit 3% Zucker durch Verlängern der Frist ihres Wachsens auf 12 Std. nicht gefördert, obgleich ihr Gewicht sich dabei fast verdoppelte (von 0,444—0,814 g).

Was die Anhäufung der Glukon- und Oxalsäuren durch die Pilzdecken in Zuckerlösungen betrifft, so hängt sie von der Konzentration des Zuckers im Nährboden, auf dem sie aufgezogen wurde, nicht ab.

Der Vergleich des Gewichts der Pilzdecke vor ihrer Übertragung auf die Zuckerlösung mit ihrem Gewicht nach Abschluß des Versuchs zeigt, daß sie auf Zuckerlösungen sehr anwachsen; dies ist gewöhnlich in den ersten Tagen nach dem Ersatz des Nährbodens durch die Zuckerlösung zu sehen. Hierin kann man wohl die Ursache suchen, daß die Ausbeute der Zitronen-

säure in bezug auf den in der ersten Zuckerlösung ausgenützten Zucker gewöhnlich kleiner ist.

2. Gärung des Nährsubstrates.

Die Anwendung „fertiger Pilzdecken" zur Bildung der Zitronensäure wird dadurch erschwert, daß wir keine objektiven Angaben darüber besitzen, zu welchem Zeitpunkt man am besten die Übertragung der Pilzdecke auf die Zuckerlösung vornehmen soll.

Kostytschew (8) weist darauf hin, daß die Nährlösung, auf der die Pilzdecke gezogen wird, zu einem bestimmten Zeitpunkt abgegossen werden soll, und zwar vor der Fruktifikation, die gewöhnlich am 2. Tage eintritt; dies darf aber nicht verallgemeinert werden.

Wir haben festgestellt (1), daß die Pilzdecke verschiedener Stämme ihre höchste Aktivität bei verschiedenen Fristen ihres Wachstums auf Nährböden zeigen. So ist z. B. die dreitägige Decke des Stammes 7 am aktivsten, beim Stamme 1 a ist es die zweitägige; beim Stamme 7 beobachtet man auf der Nährlösung Sporenbildung bereits am 2. Tage, wogegen beim Stamme 1 a auf der Nährlösung Sporenbildung überhaupt nicht eintritt, auch auf der Zuckerlösung bleibt sie eine Zeitlang aus.

Dies hat uns dazu geführt, die Bedingungen zu ermitteln, bei welchen Zitronensäure in demselben Medium gebildet wurde, auf dem die Pilzdecke gezogen war.

Zwecks Einschränkung der Entwicklung der Pilzdecke wurde im Nährboden, der zum Aufziehen der „fertigen Decken" gewählt wurde, die Menge des Stickstoffs und in Verbindung damit auch die der Aschenelemente verringert und zur Sicherung der Anhäufung der Zitronensäure die Menge des Zuckers — vergrößert.

Zusammensetzung der Nährmischung Nr. 2:

NH_4NO_3	0,15%	$FeCl_3$	0,0014%
KH_2PO_4	0,033%	$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,0022%
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,0083%	Zucker	20%

Die Bildung der Zitronensäure auf dem Nährboden Nr. 2 wurde mit derjenigen auf der ersten Zuckerlösung durch „fertige Pilzdecken" verglichen; diese Decken wurden in üblicher Weise auf dem Nährboden mit 5% Zucker, wie beim ersten Versuch erwähnt, aufgezogen[1]).

Auf Nährboden Nr. 2 blieb der Pilz 8 Tage, auf Nährboden Nr. 1 zwei Tage und auf der Zuckerlösung 6 Tage (2 Tage + 6 Tage = 8 Tage). Dann wurden Nährboden Nr. 2 und die erste Zuckerlösung, auf denen die „fertigen Pilzdecken" waren, abgegossen und durch 100 ccm einer 15 proz. Zuckerlösung ersetzt.

Versuch Nr. 2 wurde mit den Pilzstämmen 1 a und L[2]) durchgeführt. Der Stamm 1 a wurde bei 30 und 25°, der Stamm L bei 30° gezogen. Die Pilzdecke entwickelte sich auf Nährboden Nr. 2 langsamer, als auf Nährboden Nr. 1. Der Stamm 1 a hat bis zum Ende des Versuchs keine Sporenbildung gezeigt, die Pilzdecken des Stammes L bedeckten sich mit Sporen am 4. Tag nach dem Aussäen. Am 10.—12. Tag nach dem Aussäen wurden die Pilzdecken des Stammes L schleimig.

Die Analysendaten dieser Kulturen sind in Tab. 3 und 4 zusammengefaßt.

---

[1]) Wir wählten die Mengen von Zucker und von NH_4NO_3, die W. S. Butkewitsch bei einer Reihe seiner Versuche angewandt hat (12).

[2]) Der Stamm L ist von der Zitronensäure-Fabrik in Leningrad bezogen worden.

Tabelle 3.

Analyse	Gärung der Nährlösung			„Fertige Decken“		
	Nährlösung	Zuckerlösung		Zuckerlösung		
		1	2	1	2	3
Stamm 1a						
Gesamtazidität 10 ccm in ccm 0,1 n NaOH	97,43	104,04	86,24	104,91	122,4	84,47
Zitronensäure in g	7,07	6,54	5,58	6,23	7,57	5,53
Glukonsäure in g	0,489	0,481	0,654	0,302	2,003	0,693
Oxalsäure in g	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zuckerrest in g	11,41	5,37	6,67	3,43	5,47	6,85
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf den verbrauchten Zucker in %	56,0	67,9	63,2	53,8	79,4	67,8
Stamm L						
Gesamtazidität 10 ccm in ccm 0,1 n NaOH	118,96	60,18	27,14	82,53	28,5	20,15
Zitronensäure in g	9,96	3,54	1,80	3,88	1,79	1,38
Glukonsäure in g	0,646	0,457	nicht best.	0,392	nicht bestimmt	
Oxalsäure in g	0,0	0,290	„	0,621	„	„
Zuckerrest in g	10,84	6,69	„	3,61	„	„
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf den verbrauchten Zucker in %	75,6	42,5	„	34,0	„	„

Tabelle 4.

Stamm	Stamm 1a		Stamm L	
	Gärung des Nährsubstrats	„fertige Decken“	Gärung des Nährsubstrats	„fertige Decken“
Menge des während des Versuches zugegebenen Zuckers in g	54	51	54	51
Menge des in allen Lösungen zurückgebliebenen Zuckers in g	23,45	20,50	—	—
Menge der Zitronensäure in allen Lösungen in g	19,19	19,33	15,30	7,05
Pilzdeckengewicht vor der Übertragung auf die Zuckerlösung in g	1,361	0,953	1,763	0,657
Pilzdeckengewicht am Ende des Versuches in g	2,239	2,451	4,089	3,964
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf den verbrauchten Zucker in %	62,80	63,0	—	—

Die Analyse der Lösungen, die unter der Pilzdecke des Stammes 1a gewesen sind, zeigt, daß im Fall von Nährboden Nr. 2 mehr Zitronensäure angehäuft ist als auf der ersten Zuckerlösung mit präliminar aufgezogener Pilzdecke. Die Anhäufung der Zitronensäure durch Pilzdecken des Nährbodens Nr. 2 fand auch auf reinen Zuckerlösungen statt; ihre Menge war in diesem Fall etwas kleiner als auf der zweiten und dritten Zuckerlösung, bei ihrer Gärung mit „fertigen Pilzdecken“.

Im allgemeinen stellte es sich heraus, daß während einer gleichlangen Zeitperiode aus einer gleichen Menge verbrauchten Zuckers die Pilzdecken des Stammes 1a gleiche Mengen Zitronensäure gebildet hatten, unabhängig

davon, ob sie auf Zuckerlösungen nach der Gärung des Nährmediums Nr. 2 übertragen wurden, oder ob die Gärung des Zuckers mittels „fertiger Pilzdecken", die 2 Tage auf Nährboden Nr. 1 gewachsen waren, vorgenommen wurde.

Auf dem Nährboden Nr. 2 wurde die Zitronensäure durch den Stamm L sehr energisch gebildet: ihre Menge im Vergleich zu der Menge des ausgenützten Zuckers war fast 2,5 mal größer als bei Anwendung fertiger Pilzdecken.

Die Zitronensäureanhäufung auf der zweiten Lösung mit auf Nährboden Nr. 2 gezogenen Pilzdecken verringerte sich merklich, obwohl sie größer war als beim Versuch mit fertigen Pilzdecken (3,54—1,79 g).

Wir sehen somit, daß trotz der letzten Angaben Kostytschews und Bergs (10) es zweckmäßiger ist, den Nährboden Nr. 2 anzuwenden, als fertige Decken zu nehmen, denn wir erhalten dadurch die Möglichkeit, beim industriellen Betrieb eine ziemlich verantwortliche Operation zu umgehen, und zwar den Ersatz des Nährbodens durch Zuckerlösung.

Der Vergleich der untersuchten Stämme miteinander hat gezeigt, daß die Pilzdecken des Stammes 1 a ihre Aktivität lange Zeit bewahren, während die Decken des Stammes L diese bald einbüßen. Es ist daher verständlich, daß man ein und dieselbe Pilzdecke des Stammes 1 a bei Zitronensäurefabrikation 2—3 mal länger ausnützen kann als die des Stammes L.

3. Zuckerkonzentration im Nährboden Nr. 2.

Die Angaben zahlreicher Forscher über die optimale Zuckerkonzentration im Medium, das zugleich zum Aufziehen der Pilzdecke und zur Bildung der Zitronensäure ausgenützt wird, weichen stark voneinander ab (13—16).

In dem gegebenen Versuch haben wir Nährböden untersucht, welche 15, 20, 25 und 30% Zucker enthielten.

Dieser Versuch sowie auch alle nachfolgenden wurden bei 30° durchgeführt.

Die Kulturen wurden nach 8 und 14 Tagen analysiert. Die Analysenergebnisse findet man auf Tab. 5.

Tabelle 5.

Versuchsdauer in Tagen	8				14			
Zuckerkonzentration im Medium in % . . .	15	20	25	30	15	20	25	30
Gesamtazidität der Flüssigkeit in ccm 0,1 n NaOH	745,5	1450,5	1228,5	1264,5	814,5	1528,5	1965,8	1863,0
Zitronensäure in g (nach Gesamtazidität berechnet)	5,22	10,15	8,60	8,85	5,70	10,69	13,75	13,4
Zuckerrest in g	5,16	8,39	14,97	19,37	2,07	5,59	9,15	12,9
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf den verbrauchten Zucker in %	40,6	65,0	57,2	53,2	35,8	58,06	68,9	56,4
Gewicht der Pilzdecken in g	1,581	1,618	1,618	1,807	1,788	—	1,901	2,322

Die Zitronensäure ($C_6H_8O_7H_2O$) wurde nach Gesamtazidität berechnet, die auch die Glukon- und die Oxalsäuren einschließt; da aber die Glukonsäure in relativ kleiner Menge und die Oxalsäure nur in Spuren vorhanden waren, weicht die in den Tabellen 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 angeführte Menge der Zitronensäure um ein Geringes von ihrem wahren Gehalt ab.

In 8 tägigen Kulturen häufte sich auf einem Nährboden mit 20% Zucker mehr Zitronensäure an, wobei ihre Ausbeute in bezug auf den ausgenützten Zucker ebenfalls größer als in anderen Kulturen war.

Maximale Anhäufung der Zitronensäure in 14 tägigen Kulturen wurde auf dem Nährboden mit 25% Zucker beobachtet.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, daß die 20 proz. Zuckerkonzentration für den Nährboden Nr. 2 die optimale ist, denn bei dieser Zuckerkonzentration häuft sich in dem Medium in kurzer Zeit mehr Zitronensäure an als in den anderen Fällen.

Folgender Versuch wurde angestellt zwecks Feststellung jener Konzentration der Zuckerlösungen, die für die Anhäufung der Zitronensäure in ihnen optimal ist.

4. Konzentration der Zuckerlösungen.

Die Pilzdecken für diesen Versuch wurden auf Nährboden Nr. 1 (1—16) 2 Tage lang wachsen gelassen; die Decken (17—32) auf Nährboden Nr. 2 8 Tage lang[1]); dann wurden die Nährmischungen abgegossen und durch 100 ccm 15, 20 und 25% Zuckerlösungen ersetzt. Die Kulturen wurden 6 Tage auf diesen Zuckerlösungen gelassen.

Im Laufe des Versuchs wurden die Zuckerlösungen zweimal gewechselt. Die Daten der Analyse der Zuckerlösungen findet man auf Tab. 6.

Tabelle 6.

Zuckerlösung	1			2		
Konzentration der Zuckerlösung	15	20	25	15	20	25
Kulturen 1—16	5—8	9—12	13—16	5—8	9—12	13—16
Gesamtazidität 10 ccm in ccm 0,1 n NaOH	140,5	187,8	208,8	135,5	157,5	174,0
Zitronensäure nach Gesamtazidität berechnet in g	8,92	12,22	13,26	9,48	11,02	12,21
Zuckerrest in g	0,71	3,07	5,47	3,03	6,71	12,23
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf verbrauchten Zucker in %	62,4	72,2	67,9	79,2	82,9	95,6
Gewicht der Pilzdecke am Ende des Versuches in g[2])	—	—	—	2,816	3,265	3,498
Kulturen 17—32	21—24	25—28	29—32	21—24	25—28	29—32
Gesamtazidität 10 ccm in ccm 0,1 n NaOH	159,3	189,6	206,08	130,5	159,5	166,8
Zitronensäure nach Gesamtazidität berechnet in g	10,36	12,60	13,41	9,13	11,16	11,67
Zuckerrest in g	2,17	4,65	9,33	3,18	6,45	12,20
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf verbrauchten Zucker in %	80,7	82,2	85,5	77,2	82,3	90,1
Gewicht der Pilzdecken am Ende des Versuches in g[3])	—	—	—	2,495	2,706	2,869

[1]) Im Laufe dieser Zeit bildeten sich in diesem Medium 6,28 g Zitronensäure.
[2]) Gewicht der Pilzdecken vor der Übertragung auf Zuckerlösungen = 0,919 g.
[3]) Gewicht der Pilzdecken vor der Übertragung auf Zuckerlösungen = 1,289 g.

Tabelle 7.

Zuckerlösungen	1			
Dauer des Stehenlassens der Pilzdecke auf Zuckerlösungen in Tagen . . .	6	8	10	12
Konzentration der Zuckerlösung in %	15	20	25	30
Gesamtazidität 10 ccm Flüssigkeit in ccm 0,1 n NaOH	60,75[1])	141,9	197,4	237,9
Zitronensäure (nach Gesamtazidität berechnet in g)	3,30	7,94	11,58	14,40
Zuckerrest in g	3,56	3,71	4,23	5,66
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf den verbrauchten Zucker in %	28,8	48,7	55,7	68,4

Aus den angeführten Daten ist ersichtlich, daß die Bildung der Zitronensäure auf der ersten Zuckerlösung um so intensiver verlief, je höher die Konzentration der Zuckerlösung war. Es steigt jedoch die Anhäufung der Zitronensäure nicht entsprechend dem Anwachsen der Zuckerkonzentration im Medium, sondern in einem geringeren Ausmaß.

In der zweiten Zuckerlösung besteht dieselbe Abhängigkeit der Zitronensäurebildung von der Zuckerkonzentration, wie in der ersten Lösung, nur ist die durch das Anwachsen des Zuckergehalts bewirkte Beschleunigung ihrer Bildung geringer als in dem ersten Fall.

Hieraus folgt, daß, wenn man die Pilzdecken auf den Zuckerlösungen 6 Tage stehen lassen will, man die 20 proz. Zuckerlösung als die optimale für die Zitronensäureanhäufung bezeichnen muß, denn obgleich auf den Lösungen von höherer Konzentration sich mehr Zitronensäure bildet, bleibt jedoch in diesem Fall in ihnen eine größere Menge nicht ausgenützten Zuckers zurück.

Es ist selbstverständlich, daß, um eine vollere Gärung der Lösungen mit hohem Zuckergehalt zu erzielen, man die Pilzdecken auf diesen längere Zeit lassen muß, als auf den schwachen Lösungen. Daher wurde der Versuch 5, in dem wiederum 15-, 20-, 25- und 30 proz. Zuckerlösungen geprüft wurden, nach folgendem Schema angestellt.

Versuchsschema.

Nr. der Kulturen	Dauer des Gärens auf Zuckerlösung allein in Tagen	Zahl der gewechselten Zuckerlösungen	Zeit, in der die Pilzdecke auf der Zuckerlösung blieb in Tagen	Zuckerkonzentration in den Lösungen in %	Menge des eingeführten Zuckers in g
4—6	6	4	24	15	60
7—9	8	3	24	20	60
10—12	10	2	20	25	50
13—15	12	2	24	30	60

Aus diesem Schema sehen wir, daß unter alle Pilzdecken dieselbe Menge Zucker eingeführt wurde, daß sie gleich lange Zeit auf den Zuckerlösungen

[1]) Pilzdecken 4—6 verschleimten in den ersten Tagen, doch später verbesserte sich ihr Zustand.

Tabelle 7.

2				3		4
6 15	8 20	10 25	12 30	6 15	8 20	6 15
123,52	154,3	179,97	157,47	116,8	125,03	97,41
8,23 4,88	10,18 6,50	12,82 7,74	11,46 10,26	7,65 4,66	9,59 6,72	7,02 5,64
81,3	75,4	74,2	55,8	74,0	72,2	75,0

bleiben, doch auf jeder Zuckerlösung ist die Dauer des Gärens der Zuckerkonzentration in diesen Lösungen direkt proportional.

Alle übrigen Bedingungen sind dieselben, wie für Kulturen 1—16 des Versuchs 4.

Die Ergebnisse der Analyse der Zuckerlösungen sind in Tab. 7 und 8 zusammengefaßt.

Die Daten der Tab. 7 und 8 zeigen, daß aus der gleichen Menge Zucker, in ein und derselben Zeit, fast gleiche Mengen Zitronensäure gebildet werden, unabhängig von der Konzentration des Zuckers in den angewandten Lösungen.

Tabelle 8.

Zeit, während der die Pilzdecken auf den Zuckerlösungen gelassen wurden, in Tagen	6	8	10	12
Zahl der gewechselten Zuckerlösungen . . .	4	3	2	2
Gesamtdauer des Stehenlassens der Decken auf den Zuckerlösungen in Tagen	24	24	20	24
Gesamtmenge des eingeführten Zuckers in g	60	60	50	60
Konzentration des Zuckers in den Lösungen in %	15	20	25	30
Zitronensäure in allen Zuckerlösungen in g	26,20	27,71	24,40	25,80
Der in allen Zuckerlösungen zurückgebliebene Zucker in g	18,74	16,93	11,97	15,92
Ausbeute an Zitronensäure in bezug auf den verbrauchten Zucker in %	63,6	64,3	64,1	58,6

Die Anwendung von Zuckerlösungen höherer Konzentration hat den Vorzug vor der Anwendung von schwächeren, daß man die ersteren beim Gären nicht so oft durch neue ersetzen muß; außerdem erhält man dabei Zitronensäurelösungen höherer Konzentration, aus denen man diese leichter ausscheiden kann.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Prof. Dr. W. S. Butkewitsch für seine aufmerksame Leitung bei der Ausführung der Arbeit den tiefsten Dank auszusprechen.

Schlußfolgerungen.

1. Die Untersuchung von Nährböden, welche 10, 5 und 3% Zucker enthalten, hat gezeigt, daß Pilzdecken auf Nährmedien mit 3—5% Zuckergehalt aufgezogen werden können, da die Zitronensäure auf Zuckerlösungen

fast in gleichen Mengen durch Pilzdecken gebildet wird, wie sie auf Nährlösungen mit 5 und 10% Zucker gezogen wurden. Pilzdecken, welche auf Nährböden mit 3% Zuckergehalt gezogen wurden, bilden weniger Zitronensäure nur auf der ersten Zuckerlösung, auf der dritten Lösung bilden sie diese sogar in größerer Menge.

2. In dem Nährsubstrat, auf dem die Pilzdecken aufgezogen werden und in dem Zitronensäure angehäuft wird, kann man dieselbe Menge Säure erhalten wie auf reiner Zuckerlösung, die mit präliminar aufgezogenen Pilzdecken vergoren wurde. Die Anwendung dieses Nährbodens vereinfacht den Prozeß der Zitronensäuregewinnung.

3. Im Nährboden mit 20% Zuckergehalt häuft sich im Laufe von 8 Tagen mehr Zitronensäure an als in Lösungen mit 15, 25 und 30% Zucker.

4. Die Zitronensäurebildung verläuft in den Zuckerlösungen um so schneller, je höher die Konzentration dieser Lösungen ist; wenn man die Menge des nicht ausgenützten Zuckers in den Lösungen in Betracht zieht, kann man bei 6 tägiger Gärung die 20 proz. Zuckerlösung als optimale Konzentration betrachten.

5. Die Gesamtmenge der Zitronensäure, die im Laufe derselben Periode aus der gleichen Menge Zucker auf 15-, 20-, 25- und 30 proz. Zuckerlösungen entstanden ist, ist die gleiche und hängt nicht von der Konzentration der angewandten Lösungen ab, wenn die Dauer der Gärung jeweils der Konzentration proportional war.

Literatur.

1. Butkewitsch, Wl. und Barinowa, S., Schriften des Zentr. Biochem. Forschungsinstituts der Nahrungs- und Genußmittelindustrie. Bd. 2. 1932. S. 163. — 2. Elfving, F., Ztschr. f. Bot. Bd. 13. 1921. S. 42. (Ref.) — 3. Butkewitsch, Wl., Biochem. Ztschr. Bd. 142. 1923. S. 195. — 4. Bernhauer, K., Biochem. Ztschr. Bd. 172. 1926. S. 236. — 5. Frey, A., Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 2. 1931. S. 272. — 6. Amelung, Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 166. 1927. S. 161. — 7. Kostytschew, S. und Tchesnokow, W., Planta, Archiv wiss. Bot. Bd. 4. 1927. S. 181. — 8. Kostytschew, S., Schriften des Zentr. Biochem. Forschungsinstituts der Nahrungs- und Genußmittelindustrie. Bd. 2. 1932. S. 70. — 9. Kostytschew, S. und Berg, W., Abhandl. des Zentralinstituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Bd. 5. 1933. S. 8. — 10. Protodjakonow, O., Abhandl. des Zentralinstituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Bd. 5. 1933. S. 231. — 11. Butkewitsch, Wl., Biochem. Ztschr. Bd. 131. 1922. S. 327. — 12. Butkewitsch, Wl., Biochem. Ztschr. Bd. 142. 1923. S. 195; Bd. 182. 1927. S. 99. — 13. Herzog, R. und Polotzky, Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 59. 1909. S. 125. — 14. Bernhauer, K., Die oxydativen Garungen. Berlin 1932. — 15. Falk und van Beyma thoe Kingma, Ber. d. dtsch. chem. Gesellsch. Bd. 57. 1924. S. 914. — 16. Porges, N., Amer. Journ. of Botany. Vol. 19. 1932. p. 559.

Referate.

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Koblmüller, L. O., Zur Formänderung von Keimen unter Einfluß von Lithiumchlorid. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 17—28.)

An Hand von 1600 Einkeimversuchen wird gezeigt, daß die Gestaltsumwandlung mancher Keime unter der Einwirkung von Lithiumchlorid Ausdruck einer durch dieses Salz hervorgerufenen Krankheit ist: Die Gestaltsumwandlung tritt nur an lebenden Keimen auf, ist also eine Lebenserscheinung. Sie zeigt sich, wenn überhaupt, an allen lebenden Keimen einer reinen Zucht, nicht etwa nur an einem Teil. In lithiumchloridfreier Umwelt können aus einem Teil der formveränderten Keime wieder solche von gewöhnlichem Aussehen hervorgehen. Die Fortpflanzungsfähigkeit stärker formveränderter Keime steht im umgekehrten Verhältnis zur Schwere der Gestaltsänderung. Die formändernde Wirkung des Lithiumchlorids ist also von einer fortpflanzungshemmenden, schädigenden Wirkung begleitet.

Die Frage der biologischen Bedeutung der sog. Involutions- oder Degenerationsformen ist damit für einen Sonderfall gelöst. Für krankhafte Wuchsformen wird die Bezeichnung „Siechformen" oder „formae pathologicae" vorgeschlagen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Olenov, J. M., On the adaption value of experimentally provoked heriditary changes in yeasts. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 48—61.)

Verf. suchte festzustellen, ob eine durch Radiumemanations-Bestrahlung künstlich erzielte neue Heferasse in ihren neuen Eigenschaften Anpassungswert besitzt. Das war in der Tat der Fall: Denn die neue Rasse vermehrte sich in Bierwürze stärker und nutzte den Zucker besser aus als die Ausgangsrasse. In Mischkultur ferner mit dieser gezogen, verdrängte sie die Ausgangsrasse nach 2—3 Überimpfungen. Rippel (Göttingen).

Lockemann, G. und Ulrich, W., Zur Kenntnis der keimschädigenden Wirkung von Rhodaniden. II. Mitteilung. Über die keimtötende Wirkung alkalischer Rhodanidlösungen. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1936. S. 768—777.)

Die keimtötende Wirkung der Hydroxylionen und die der Rhodanidionen wird durch die gleichzeitige Anwesenheit dieser Ionen wechselseitig gesteigert. Dies gilt sowohl gegenüber den vegetativen Formen wie auch gegenüber den Bakteriendauerformen. Die Verstärkung der bakteriziden Wirkung der Hydroxylionen durch die Gegenwart von Rhodanionen ist erheblich geringer als bei den Wasserstoffionen.

Das durch Zusatz von Alkalirhodanid zu Natronlauge gesteigerte Keimabtötungsvermögen der Hydroxylionen geht auch bei höheren Zusätzen nicht wieder zurück, wie das z. B. nach Hailer bei Zusatz von NaCl zu NaOH gegenüber Milzbrandsporen der Fall ist.

Die Widerstandsfähigkeit der Bakterienwuchsformen gegenüber sauren und alkalischen Rhodanidlösungen ist nicht nur bei den verschiedenen Bakterienarten verschieden, sondern auch bei den verschiedenen Stämmen innerhalb derselben Bakterienart nicht unerheblichen Schwankungen unterworfen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Gagyi, J. v., Über die bakterizide und antitoxische Wirkung des Vitamin C. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 15. 1936. S. 190—195.)

Vitamin C wirkt besonders hochvirulenten Bakterien gegenüber stark bakterizid; Saprophyten sind ziemlich resistent. Die Schädigung wirkt sich bei Krankheitserregern zunächst hinsichtlich der Virulenz aus. Diphtheriebakterien, die ursprünglich ein infiziertes Meerschweinchen innerhalb von 24 Std. töteten, verursachten nach 2 Std. Aufenthalt in Vitamin C-Lösung, selbst nach mehreren Nährbodenpassagen, nur noch lokale Erscheinungen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Fehér, D. und Frank, M., Untersuchungen über die Lichtökologie der Bodenalgen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 1—31.)

In Bestätigung bisher schon bekannter Tatsachen stellen die Verff. zunächst fest, daß bis zu 1 m Tiefe im Boden grüne Algen reichlich vorkommen, vereinzelt sogar noch bis zu 2 m Tiefe, hauptsächlich Chlorophyceen und Schizophyceen, von denen die letztgenannten nach der Tiefe verhältnismäßig zunehmen. Hier wie auch im folgenden sind die betreffenden Algenarten namentlich aufgeführt.

Es wird ferner eine Liste der Algenarten gegeben, die noch nach 6 Monaten und 1 Jahr bei Dunkelkultur am Leben waren.

Sodann werden eingehende Messungen über das Eindringen des Lichtes in den Boden angestellt. Der sichtbare Teil der Strahlen geht durch Reflexion und Absorption verloren. In tiefere Schichten dringen nur die ultraroten Strahlen ein. Entsprechend angestellte Versuche mit Aufstellung der Kohlenstoffbilanz führen die Verff. zu dem Schluß, daß die Bodenalgen mit Hilfe dieser ultraroten Strahlen Kohlensäure assimilieren können.

Die relative Größe des Chlorophyllapparates im Vergleich zu der Gesamtfläche des Algenkörpers wird von den Verff. als eine Anpassung an die Ausnutzung der geringen Lichtintensitäten gedeutet. Das Vorherrschen der Cyanophyceen in größeren Bodentiefen betrachten sie als eine chromatische Adaption an die roten und ultraroten Strahlen.

Rippel (Göttingen).

Rao, G. G. und Pandalai, K. M., On the biological oxidation of ammonia by nitrite formers. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 32—48.)

Wasserstoffsuperoxyd oxydiert, unabhängig von Eisen, Ammoniak zu Nitrat. Es ist unwahrscheinlich, daß bei der biologischen Oxydation von Ammoniak zu Nitrit ein Peroxyd-Peroxydase-System beteiligt ist.

Hydroxylamin konnte bei der bakteriellen Ammoniak-Oxydation als Zwischenprodukt nicht festgestellt werden, ebensowenig Hyponitrite.

Bei Versuchen mit Zusatz von Cyaniden, die bis zu 3½ Monate ausgedehnt wurden, ergab sich eine Giftigkeit hinsichtlich der Ammoniak-Oxydation noch bei großen Verdünnungen (m/40 000 für anorganische Cyanide). Wenn nach längerer Zeit Ammoniak-Oxydation einsetzt, so ist keine Anpassung an das Gift eingetreten, sondern dieses wurde zerstört. Die Giftwirkung von Kaliumcyanid ist unabhängig von der Konzentration des Eisens, woraus Verff. schließen, daß die Cyanide eine größere Affinität zum Zellen-Eisen haben als zum Substrat-Eisen.

0,0025% Hämatin oder Hämoglobin hemmen die Ammoniak-Oxydation zu 50%.

Zusammenfassend schließen die Verff., daß die Ammoniak-Oxydation durch die Nitritbildner eine katalytisch an der Oberfläche gewisser aktiver Zentren der Zelloberfläche der Bakterien stattfindende Reaktion ist.

Rippel (Göttingen).

Czurda, V., Nachweis der Sauerstoff-Abscheidung im Assimilationsprozeß der Thiorhodaceen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 110—114.)

Die bisherigen Versuche der Sauerstoffabscheidung im Assimilationsprozeß der Thiorhodaceen nach Engelmann konnten nicht beweisend sein, da die angebliche positive O_2-Chemotaxis der Testbakterien nach van Niel auch durch negative H_2S-Chemotaxis zustande kommen konnte. Dem Verf. gelang der Nachweis der Sauerstoffabscheidung bei Chromatium dadurch, daß er über die Kultur eine Deckschicht mit 0,004% Indigkarmin brachte. Das in die darunter liegende Kulturschicht diffundierende Indigkarmin wird nach Verbrauch des Schwefelwasserstoffs durch die Oxydation blau.

Die „öligen" Schwefeltröpfchen von Chromatium zeigten im polarisierten Licht Aufbau nach Art radiär gebauter Sphärokristalle.

Rippel (Göttingen).

Püschel, J., Harnstoffzersetzung als Unterscheidungsmerkmal zwischen Diphtherie- und Pseudodiphtheriebakterien. (Klin. Wochenschr., Jahrg. 15. 1936. S. 375—378.)

Das Bact. pseudodiphtheriticum besitzt die Fähigkeit, Harnstoff unter Ammoniakbildung zu spalten. Der Nachweis dieses Fermentes an diphtherieverdächtigen Stäbchen schließt echte Diphtherie aus. Von mehreren hundert pathogenen Stämmen der Institutssammlung zersetzten nur noch Bact. abortus Bang und Bact. melitense Harnstoff. Auf Grund dieser Tatsache wird nicht nur die Identität, sondern auch die nähere Verwandtschaft zwischen Diphtherie- und Pseudodiphtheriebakterien abgelehnt. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Olson, H. C., and Hammer, B. W., Observations on yeasts causing gas in sweetened condensed milk. (Iowa State Coll. Journ. of Sci. Vol. 10. 1935. p. 37—43.)

Der beobachtete Fehler trat in gesüßter Kondensmilch auf, die während der Sommermonate hergestellt und in Tonnen abgefüllt worden war. Einige Zeit, nachdem die Tonnen die Fabrik verlassen hatten, wurde der Fehler offenbar. Vielfach waren die Tonnendeckel aufgebaucht, in manchen Fällen auch nicht. Die verdorbene Kondensmilch hatte einen hefigen Geruch und es war leicht, die für den Fehler verantwortlichen Hefen durch Ausstreichen auf hochprozentigem Rohrzucker-Agar in Reinkultur zu erhalten. Es konnten 2 Typen festgestellt werden: ein ovaler Typ (Torula lactis-condensi) und ein runder Typ, der von den Verff. als eine neue Spezies mit dem Namen Torula globosa bezeichnet wurde. Die Milchkoagulierung ging mit Torula globosa langsamer vor sich als mit Torula lactis-condensi, in der Regel erst 1—2 Tage nach eingetretener Gasbildung. In steriler kondensierter Milch, die in Reagensröhren eingefüllt

war, konnte mit beiden Arten Gasbildung innerhalb 12—17 Tagen bei 21° C erzeugt werden. Bei Verimpfung von Torula lactis-condensi auf Kondensmilch in Kannen wurde sowohl bei 21° als bei 35° C Gas gebildet, die Kannen wurden innerhalb 7—15 Tagen aufgetrieben, manche sogar gesprengt. Torula globosa erzeugte unter diesen Umständen nur bei 21° C Gas und erst innerhalb 12—15 Tagen. Ein Auftreiben oder Sprengen der Kannen konnte jedoch erst nach längerer Zeit beobachtet werden.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Cunningham, A., and Andrews, A., The Burri smear-culture method for the determination of the bacterial content of milk samples. (J. of Dairy Res. Vol. 5. 1933. p. 29.)

Verff. haben die Burri-Strichmethode mit der gewöhnlichen Plattenmethode zur Bestimmung der Bakterienzahl in Milch verglichen. Die erste ist mit viel größeren Fehlern behaftet. Diese sind durch Schwankungen in der Ösenübertragung und das regellose Kolonienwachstum auf den gewöhnlichen Strichnährboden verursacht. Davis (Reading).

Bryan, C. S., and Trout, G. M., The influence of streptococcic infection of the udder on the flavor, chloride content and bacteriological quality of the milk produced. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 777—792.)

Zur Untersuchung kam die Milch (Gesamt- und Viertelsgemelke) dreier Herden, von denen zwei mit Mastitis verseucht waren, während die dritte vollständig mastitisfrei war. Nach Ankunft im Laboratorium wurden alle Proben folgenden Prüfungen unterzogen: Reduktaseprobe, Gesamtkeimzahlbestimmung nach dem Standardplatten- und mikroskopischen Verfahren, Bestimmung des Leukozyten- bzw. Zellgehalts und Chloridgehalts sowie kultureller Nachweis der Mastitis-Streptokokken. Insgesamt kamen 258 Proben von 60 Kühen während eines Zeitraumes von 6 Wochen zur Untersuchung. Ergebnisse: 56 bzw. 90,9% der infizierten Proben von den zwei infizierten Herden hatten einen salzigen Geschmack (0,192 bzw. 0,2263% Chloridgehalt), 25 bzw. 20,5% der nicht infizierten Proben von den beiden infizierten Herden hatten ebenfalls einen salzigen Geschmack (0,167 bzw. 0,1694% Chloridgehalt), während bei der Milch der dritten überhaupt nicht infizierten Herde nur ein diesbezüglicher Prozentsatz von 14,8 vorhanden war (durchschnittlicher Chlorid-Prozentgehalt 0,1374). Die Qualität der Milch von Streptokokken-freien Kühen war sehr hoch, was sowohl die Ergebnisse der Methylenblau-Reduktaseprobe als auch die Zählung der Leukozyten und der Bakterien pro ccm betraf. Die nächstbessere Qualität von Milch wurde aus den gesunden Vierteln Streptokokken-infizierter Kühe gefunden. Die geringste Qualität besaßen die infizierten Gesamt- und Viertelsgemelke der infizierten Herden. Sie entfärbten rascher bei der Reduktaseprobe und wiesen auch einen Höchstgehalt an Leukozyten und Bakterien auf. Keine der angewandten Untersuchungsmethoden war, für sich allein angewendet, dazu geeignet, eine sichere Diagnose auf Strept. Mastitis zu gestatten. K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Damm, H. und Bartram, H., Der Nachweis von Indol in Milch und Milchprodukten. Festschrift zum 65. Geburtstag von W. Henneberg. (Druck: Molkerei-Zeitg. Hildesheim. 1935. S. 10—18.)

Die bisherigen Anschauungen über das Versagen der Indolprobe bei Gegenwart von Milchzucker werden als unhaltbar zurückgewiesen. Verff. zeigten an Hand von Untersuchungen mit Milch, Rahm und Buttermilch, daß der Einfluß des Versagens der Indolprobe nur ein indirekter ist. Der Enzymkomplex der für den Abbau des Tryptophans zu Indol verantwortlich ist, wird durch den infolge der Vergärung des Milchzuckers erniedrigten p_H inaktiviert. Ein Zusatz von Calciumkarbonat zu der Trypsinbouillonmilch und häufiges Durchschütteln während der Bebrütungszeit ließen eine einwandfreie Indolprobe mit Milch zu. Bei größeren Mengen als 1 ccm läßt sich die Prüfung auf Indolbildner zweckmäßiger durchführen, wenn statt der Trypsinbouillon eine wässerige Tryptophanlösung (1 : 100) verwendet wird. Meewes (Kiel).

Henneberg, W. und Kniefall, H., Einfluß von Kochsalz auf das Wachstum und die Zellform bei Milchsäurebakterien, Bact. coli, Bact. aerogenes und einigen anderen Milchbakterien. (Milchwirtsch. Forschungen. Bd. 17. S. 146—157, mit 5 Abb.)

Mikrokokken können z. T. noch bei 15% Kochsalz wachsen, ohne ihre Zellform zu verändern. Von den Streptokokkenarten erwiesen sich als am wenigsten salzfest: Str. lactis, Str. mastitidis (3—5% auf Agar +; 5% in Milch +). Am meisten salzfest waren Str. thermophilus (10% +), Str. faecium und Str. liquefaciens (7% auf Agar +, 8—10% in Milch +), Str. cremoris (3% auf Agar +, 10% in Milch +). Str. faecium und ein salzfester lactis-Stamm legten die Milch bei 5% Salz noch dick, Milch mit 3% wurde von thermophilus, cremoris und lactis dickgelegt. Gewöhnung an 1—2% höhere Salzmengen in Milch war möglich. — Streptobact. plantarum-Rassen vertrugen 7—15%. Strbct. casei 3% im Agar, 7% in Milch (bis 5% Gerinnung). Strbct. casei wuchs bei 3% auf Agar in Streptokokkenform (ebenso ein Betabakterium-Stamm bei 7%). Es traten auch gedrehte, unregelmäßige Formen auf.

Thermobakterien konnten noch bei 7% Salzzusatz wachsen. Die Zellformen veränderten sich (Thbct. bulgaricum lockenartig bei 3%). Auch im gedämpften, dicken Kartoffelbrei traten stark verkürzte, verbogene Formen von Thermobakterium auf. — Colistämme wuchsen noch bei 7% Salzzusatz (z. T. noch bei 10%). Die Kolonien wurden bisweilen schleimig. Das Säuerungsvermögen änderte sich. Bei 5% traten auffallende Zellformen auf, z. T. Streptokokkenformen. — Aerogenesarten bildeten schon bei 2 und 3% Salz die verschiedensten Zellformen (hefeähnliche mit Vakuolen, Kugelformen, Verästelungen, Zellfäden ohne und mit blasigen Anschwellungen). — Bact. fluorescens und B. mesentericus wuchsen auf Agar mit Salzzusatz bis 7% und zwar ohne morphologische Veränderungen. Bact. prodigiosum farblos bei 5% und mehr, bei 7% entstanden lange Fäden. Bact. putidum zeigte bei 5% Salz stark aufgetriebene Zellformen. — Corynebakterien zeigten noch bei 10% Wachstum (hier rundlichere Zellen). Bact. herbicola, linens, lactis viscosum, pyocyaneum konnten ebenfalls andere Zellformen hervorbringen. Meewes (Kiel).

Gilmour, G. van B., The bearing of hydrogen ion concentration on the flavour of Irish Free State Creamery Butter. (I. F. S. Dept. Agric. J. Vol. 32. 1933. p. 273.)

Die Wasserstoffionenkonzentration von 1292 Proben von Butter, die aus frischem pasteurisierten Rahm hergestellt waren, schwankte zwischen p_H 5,7—7,7, durchschnittlich 6,98. Der Geschmacksgrad variierte mit dem p_H in dem Sinne, daß ein höherer p_H mit einem guten Geschmack verbunden war. Verf. empfiehlt für Kontrollzwecke die Wasserstoffionenkonzentration neben der Hefe- und Schimmelpilzzahl von solcher Butter zu bestimmen.

Davis (Reading).

Gilmour, G. van B., and Cruess-Callaghan, G., Rate of growth of micro-organisms in I. F. S. creamery butter. (Ibid. Vol. 31. 1932. p. 226.)

Die Wachstumgeschwindigkeit von Hefen in Butter aus frischem Rahm ist durch den Salzgehalt oder Säuregrad nicht merkbar beeinflußt. Die Hefen wachsen nicht bei — 7° C. Bakterien wachsen schnell in dieser Butter bei 10° C, noch schneller, wenn der Salzgehalt niedriger ist. Es wurde keine Beziehung zwischen Säuregrad und Wachstumgeschwindigkeit von Bakterien gefunden. Schimmelpilze wuchsen in dieser Butter nur langsam.

Davis (Reading).

Bisby, G. R., Jamieson, M. C., and Timonin, M., The fungi found in butter. (Can. J. of Res. Vol. 9. 1933. p. 97.)

Verff. geben ein Verzeichnis von Schimmelpilzen, die in Manitoba-Butter gefunden wurden, und ihres normalen Vorkommens. Davis (Reading).

Sutton, W. S., The bottle test for the detection of bacterial contamination of butter. (Agric. Gazette of N. S. W. Australia. Vol. 40. 1934. p. 244.)

10—30 g Butter werden in einem sterilen Erlenmeyerkolben im Wasserbade bei 40—45° C geschmolzen, der Kolben wird geschüttelt und im Brutschrank bei 18—22° C gehalten. Tritt kein übler Geruch nach 24 Std. auf, so darf die Butter als einwandfrei bezeichnet werden.

Davis (Reading).

Hammer, B. W., Stahly, G. L., Werkman, C. H., and Michaelian, M. B., Reduction of Acetylmethylcarbinol and Diacetyl to 2,3 Butylene Glycol by the citric acid fermenting streptococci of butter cultures. (Res. Bull. Vol. 191. 1935. p. 383—407.)

Es sollte untersucht werden, ob die in Säureweckerkulturen nach Erreichung des Maximums unter normalen Bedingungen beobachtete Abnahme des Acetylmethylcarbinol- und Diacetyl (A + D)-Gehaltes auf einer Reduktion dieser Substanzen zu dem entsprechenden Glykol beruht. Die Versuche wurden mit Zitronensäure vergärenden Streptokokken durchgeführt und zwar an Hand von Tomatenbouillonkulturen und Milchkulturen. Bei Zugabe von A und D konnte ein Verschwinden dieser Substanzen festgestellt werden unter einer entsprechenden Zunahme von 2,3-Butylenglykol. Wurde D allein zugegeben, stieg sowohl der Gehalt an A als auch an Glykol. Bei Zugabe verschiedener Mengen Schwefelsäure wurde A bei den höheren p_H -Werten nicht gebildet, sondern nur bei den niedrigen p_H-Werten. Die Zugabe von 0,65% Zitronensäure zu Milchkulturen ergab eine Zunahme sowohl von A wie von Glykol. Wurden Reinkulturen der Zitronensäurevergärer bis zu p_H 3,9 angesäuert, so konnte durch Zugabe von Acetaldehyd oder Propionaldehyd der gebildete Betrag an A gesteigert werden unter gleichzeitigem Rückgang des Glykols und der gesamten Molarität

der beiden Verbindungen. Die Ursache hierfür ist nicht in einer Neubildung von A durch Aldehydkondensation, sondern wahrscheinlich in einer verminderten Reduktion des Karbinols zu suchen. Wurden reife Säureweckerkulturen zu einer geringen Acidität neutralisiert, konnte in den meisten Fällen eine rasche Abnahme des Karbinols unter entsprechender Zunahme des Glykols beobachtet werden. Die Reduktion des A konnte durch Zugabe von 1% Natriumfumarat oder 12% Kochsalz verhindert werden, desgleichen durch Herstellung von Eiswassertemperaturen. Es erwies sich auf Grund der Untersuchungen, daß die in der Praxis geübte Gepflogenheit, im Säurewecker zunächst eine hohe Acidität zu erzielen und anschließend darauf tief zu kühlen, sehr zweckmäßig ist, weil die Bildung des A (als Muttersubstanz des Diacetyls) begünstigt und seine unerwünschte Reduktion verhindert wird. In gesalzener Butter dürfte das zugefügte Natriumchlorid im Verein mit den tiefen Lagerungstemperaturen einen Faktor darstellen, der das Verschwinden des Acetylmethylcarbinols verhindert.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Moir, G. M., Starters for cheese and butter making-methods of preparation and maintenance. (New Zealand Dept. Agric. Bull. Vol. 162. 1933.)

Verf. schildert einen einfachen Apparat für die Herstellung von Stammkulturen. Er besteht aus einem kupfernen Wasserbehälter, in welchem das Wasser mittels einer Dampf-Kupferspirale erhitzt wird. Der überschüssige Dampf sterilisiert Impfpipetten. In diesem Behälter können die Milchflaschen sterilisiert, gekühlt und bebrütet werden. Davis (Reading).

Lane, C. B., and Hammer, B. W., Bacteriology of cheese. II. Effect of Lactobacillus casei on the nitrogenous decomposition and flavor development in Cheddar cheese made from pasteurized milk. (Iowa Agr. Exp. Stat. Res. Bull. Vol. 190. 1935. p. 343—376.)

Jede der 9 Serien Käsereiversuche bestand aus 3 Käsungen. Es wurden Käse aus Rohmilch (R), aus dauerpasteurisierter Milch ohne Reinkulturzusatz (P) und aus dauerpast. Milch mit Zusatz von L. casei (= Streptobact. casei Orla-Jensen)-Kulturen (P + K) hergestellt. Hierbei kamen 8 verschiedene Stämme dieser Art zur Prüfung, die Beimpfung der Kesselmilch erfolgte mit 1,5% einer Milchkultur. Bei allen Käsen wurde ein gewöhnlicher Handelssäurewecker verwendet. Die Untersuchungsmethoden waren dieselben, wie die im ersten Beitrag geschilderten (siehe Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 94. 1936. S. 360).

Ergebnisse: In allen Käsen konnte ein ständiger Abbau des Proteins festgestellt werden. 6 von 8 L. casei-Stämmen verursachten während der ganzen Reifungsperiode einen rascheren und ausgiebigeren Eiweißabbau im Vergleich zu solchen Käsen, die nicht mit diesen Organismen infiziert waren. Die anderen beiden L. casei-Stämme hatten nur wenig Einfluß auf den Ablauf des Proteinabbaus. Abgesehen von der in Trichlor-Essigsäure unlöslichen Fraktion waren im allgemeinen alle Eiweißfraktionen bei den R-Käsen und den mit den erwähnten 6 Stämmen infizierten P + K-Käsen größer als die entsprechenden Beträge von den P-Käsen. Dies galt ganz besonders vom Gesamtstickstoff und der in Trichlor-Essigsäure löslichen Eiweißfraktion. Anderseits war die Menge des in Trichlor-Essigsäure unlöslichen Stickstoffs bei den P-Käsen größer als bei den anderen beiden Käsetypen. Auch in der Sinnenprüfung (Geschmack und Geruch) schnitten die P + K-Käse besser ab als die beiden anderen Typen. Die Ware war im großen ganzen nicht nur einheitlicher, sondern erreichte auch eine höhere Punktzahl. Während 3 von den L. casei-Stämmen den Käsen anscheinend ein typisches Cheddar-Aroma verliehen, zeigte sich bei den mit 3 anderen Stämmen infi-

zierten Käsen ein mehr butterähnliches Aroma, das sehr angenehm wirkte (Diazetylgehalt!). Die R-Käse hatten immer Cheddar-Geschmack, während die P-Käse fast durchweg eine geringe Punktzahl erhielten (Aroma-Mangel oder sogar bitterer Geschmack). — Des weiteren wurde auch der Einfluß studiert, den die L. casei-Langstäbchen auf die Zahl und die Art der übrigen im Käse auftretenden Mikroorganismen ausübte. Die höchsten Bakterienkeimzahlen wurden jeweils schon nach verhältnismäßig kurzer Reifezeit erhalten; sie variierten bei den R-Käsen von 640—1640 Mill., bei den P-Käsen von 400—910 Mill. und bei den P-+ K-Käsen von 2320—2600 Mill. pro Gramm. Während der gesamten Reifungsperiode waren nicht bloß die Gesamt-Keimzahlen beim P-+ K-Käsetyp beträchtlich höher als bei den anderen beiden Versuchstypen, sondern es übertraf auch die Zahl der L. casei-Langstäbchen die der anderen Mikroflora ganz beträchtlich. Dieser Zustand trat bei den anderen beiden Typen erst während des Endstadiums der Reifung ein. Die R-+ P-Käse hatten mitunter ganz ausgesprochene Geschmacksfehler, während dies niemals der Fall war bei solchen Käsen, die unter Verwendung von L. casei-Kulturen hergestellt worden waren.

Ganz allgemein steht jedenfalls fest, daß bestimmte Stämme von L. casei einen günstigen Einfluß auf die Reifungsvorgänge im Cheddarkäse ausüben, insofern, als der Eiweißabbau intensiver ist, das Aroma gehoben wird und eine gewisse Sicherheit der Erzeugung gewährleistet wird.

Die Theorie von Gorini über die Bedeutung der Acidoproteolyten bei der Käsereifung konnte für den Cheddar-Käse nicht bestätigt werden; denn es fanden sich immer nur wenige Vertreter dieser Gruppe (Strept. liquefaciens) in den Käsen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Bondioli, M., Un metodo diretto per lo studio della flora microbica del formaggio. (Annali dell' Istituto sperimentale di caseificio in Lodi. Vol. 9. 1931. p. 31—37.)

Bei der neuen Methode ist weder Paraffin noch das Passieren einer Alkoholreihe notwendig. Der zu untersuchende Käse wird zunächst in Würfel von ca. 0,5 cm Kantenlänge geschnitten, die man zum Austrocknen bzw. Härten in einen Exsikkator mit Schwefelsäure verbringt. In weniger als 24 Std. ist bei Hartkäsen im allgemeinen der erwünschte Härtegrad erreicht, bei Weichkäsen dauert es länger. Vor dem Schneiden entfernt man die oberflächliche Schicht der Würfel. Geschnitten wird in etwa 10 μ Dicke mittels Mikrotom. Die Schnitte verbringt man erst in ein Xylolbad, nach wenigen Augenblicken in mit Essigsäure schwach angesäuerten 90proz. Alkohol (3 Tropfen auf 100 ccm Alkohol), darauf zu 3 oder 4 auf einen gut gereinigten Objektträger. Nach Antrocknen auf einem Heizgestell erfolgt die Färbung. Als Farblösung dient eine alkoholische Karbolthioninlösung, worin sie eine schöne violette Farbe annehmen (Längst-Färbezeit etwa 15—20 Min.). Nach Abspülen mit Wasser folgt das Differenzieren in folgender Lösung: Alkohol 50, Aq. dest. 50 und Azeton 1 ccm, bis die Schnitte bei Durchsicht im Licht eine bläuliche Färbung zeigen. Nach der Differenzierung wird wieder abgespült, und zwar am besten mit Wasser, dem 1% Essigsäure zugefügt ist. Anschließend erfolgt wieder Trocknen bei mäßiger Hitze. Man kann dann entweder direkt Zedernöl auf die Schnitte geben oder sich Dauerpräparate mit Kanadabalsam anfertigen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Hofmann, W., Zur Kenntnis der Bakterien und Pilzflora des Camembertkäses in verschiedenem Reifungszustand. Inaug.-Diss. Kiel. 1935. 43 S., 8 Abb.

80 Camembertkäse wurden nach den verschiedensten Richtungen hin untersucht. Die Milchsäurebakterien behalten in allen Reifungsstadien die Vorherrschaft. Milchsäurestreptokokken und Streptobakterien, Oospora und Penicillien, vielleicht auch Mikrokokken, bilden die obligate Flora des Camembertkäses. In einem Falle wurde eine Hefe als Aromabildner festgestellt. Oosporastämme waren nur imstande, einen rein käsigen Geruch und Geschmack zu erzeugen. — Den Fehler der Bitterkeit konnten anscheinend auch Milchsäurelangstäbchen hervorrufen. — Camembertkäse aus roher wie

aus pasteurisierter Milch zeigte im Innern stets Bact. coli. — In 12 untersuchten Käsen konnten Alkalibildner nachgewiesen werden. Tetrakokken und die Fluorescens-putidum-Gruppe scheinen ziemlich unschädlich zu sein im Gegensatz zu Vertretern der Alcaligenes- und Cloacae-Gruppe.

Meewes (Kiel).

Rubenchik, L. J., and Halperin, M. B., The effect of sodium chloride on the multiplication of bakery yeasts. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 57—72.) [Russ. m. engl. Zusfassg.]

Die Vermehrung der Bäckerhefe fand bei allen geprüften NaCl-Konzentrationen statt, wenngleich eine mit der Konzentration ansteigende Hemmung dieses Vorganges festgestellt wurde. Den verschiedenen NaCl-Konzentrationen entsprachen verschiedene Optima in der Reaktion des Nährmediums. Die vielen Gipfelpunkte in der Wachstumskurve der Hefe werden nach Ansicht der Verff. durch gleichzeitig stattfindende Autointoxikation und Autostimulation hervorgerufen. Bortels (Berlin-Dahlem).

Bestimmung der Gärkraft der Hefe, insbesondere in Brotteig. **Brabender Elektromaschinen** G. m. b. H., Dresden. DRP. 624 990, Kl. 6 a.

Man mißt den Auftrieb der in ihrem Volumen sich ändernden Teigmasse zusammen mit dem darin entwickelten Gärgas in einer Flüssigkeit. — In einer Abbildung ist die zur Anwendung gelangende Vorrichtung erläutert.

Schütz (Berlin).

Christiansen, Fr., Bakteriologische Untersuchungen in der Hefefabrik und an Preßhefen. Wasser als Infektionsquelle. Alkalibildende Bakterien als Ursache von flockiger und grießiger Hefe. Die Möglichkeit ihrer Bedeutung für das Vorkommen von Aminen im Alkohol. Inaug.-Diss. Kiel. 1935. 74 S., 5 Abb.

Als Hauptinfektionsquelle in einem Hefebetrieb war das ursprünglich praktisch keimfreie Betriebswasser anzusehen. Infolge Aufbewahrens in einem offenen Vorratsbehälter trat eine erhebliche Luft- und Kontaktinfektion auf. Ferner wurde das Wasser durch Belüftung mit unfiltrierter Luft erheblich keimreicher. 12 deutsche Handelshefen zeigten vielfach die gleiche Infektion, und zwar Bakterien, die auch in den gärenden Melassewürzen aufgefunden wurden. — Mit Hilfe einer „Lauge-Probe“ (Henneberg-Christiansen) ist es möglich, sich einen sofortigen Überblick über die Stärke der Alkalibildner-Infektion einer Hefe zu verschaffen. — In der gärenden Melassewürze wurden vor allem Alkaligenesbakterien, Fluoreszenten und Proteusarten gefunden, die bisher fast überhaupt noch nicht in der Hefeindustrie beachtet wurden. — Das Grießeln der Hefe führt Verf. ebenso wie das Flocken auf bakterielle Einflüsse (Alkaligenesarten) zurück. — Das Auftreten von Aminen im Alkohol soll nach Ansicht des Verf.s solchen Bakterienarten zuzuschreiben sein, die imstande sind, die von den Hefen gebildeten Aminosäuren durch Decarboxylierung in Amine zu verwandeln. Meewes (Kiel).

Plevako, E. A., and Cheban, M. E., Biologic observations on yeasts utilizing pentoses. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 86—95.) [Russ. m. engl. Zusfassg.]

Von den beiden „Hefen“ Monilia murmanica und Oidium laminarium, die Pentosen verwerten können, werden morphologische

und biochemische Eigenschaften beschrieben. Die erstere Art verwandelt unter anaeroben Bedingungen bis zu 5% und unter aeroben bis zu 100% Xylose in Milchsäure, Essigsäure, Alkohol, Spuren von Glyzerin und große Mengen von Hefezellen. Sie vermag auch andere Zucker zu verwerten. Besonders große Mengen Alkohol werden aus Maltose gebildet. Unter aeroben Bedingungen wird der Alkohol vollständig oxydiert. Oidium laminarium entspricht der schon früher von den Verff. beschriebenen Oospora Nr. 208. Bortels (Berlin-Dahlem).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Kudzin, J. K., and Poberezhniuk, V. K., On regulating microbiologic processes in the storage of manure. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 96—102.) [Russ. m. engl. Zusfassg.]

Verff. halten die Möglichkeit für gegeben, daß in der russischen Landwirtschaft in größerem Maße Desinfektionsmittel zur teilweisen Sterilisation von Böden wie auch von organischen Düngern, insbesondere Stallmist, angewendet werden müssen. Vorläufige Versuche haben nun ergeben, daß bei richtiger Anwendung besonders von Chlorpikrin die mikrobiologischen Vorgänge im rottenden Stalldünger so geregelt werden können, daß ein völlig reifer Dung entsteht, der reich an mineralischem Stickstoff ist und fast keinen Stickstoff und keine Phosphorsäure verloren hat. Weitere Versuche sollen das Verfahren so verbessern, daß der Ablauf der Zersetzungsvorgänge im Dünger ganz in die Hände des Experimentators gegeben ist.
Bortels (Berlin-Dahlem).

Mischustin, E., Thermophile Bakterien als Bestimmer des Kulturzustandes des Bodens. [Termophilnyje bakterii kak pokazatel' okul'turennosti počwy.] (Aus den Arbeiten des Mikrobiologischen Laboratoriums des WIUAA.) (Die Chemisation der soz. Landwirtschaft. Bd. 7. 1935. S. 55—60.) [Russisch.]

Die Zahl der thermophilen Bakterien im Boden steht im Zusammenhang mit Stallmistdüngung, sowie mit dem Kulturzustand des Bodens. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen von verschiedenen Bodenarten gibt Verf. folgende annähernde Mengen von thermophilen Bakterien in diesen an (berechnet auf 1 g Boden): unbearbeitete Böden, in einer Tiefe von 0 bis 15 cm bis 1000 Stück; Böden in schlechtem Kulturzustand 1000—50 000 Stück; Böden in mittelgutem Kulturzustand 50 000—150 000 Stück; Böden in gutem Kulturzustand 100 000—350 000 Stück. Der unter 15 cm Tiefe liegende Bodenhorizont wies bedeutende Mengen thermophiler Bakterien nur in den in gutem Kulturzustand befindlichen Böden auf (50 000—200 000 Stück), in den übrigen Böden waren sie in geringer Zahl vorhanden. Für eine ganze Reihe von Bodenarten der sog. Podsol- und Waldsteppenzone kann die Feststellung der Menge thermophiler Bakterien zweifellos eine Grundlage zur Beurteilung des Kulturzustandes dieser Böden bieten und auch bestimmte Hinweise für ihre Stallmistdüngung in der Vergangenheit geben.
M. Gordienko (Berlin).

Ziling, M., Beiträge zur Kenntnis der Mikroflora der Böden Westsibiriens. [Materialy k poznaniju mikroflory počw Zapadnoj Ssibiri.] (Krankheiten der Getreidekulturen. 1932. 40 S.) [Russisch.]

Zur Untersuchung diente Schwarzerde in der Brache, unter der Sommerung (Weizen) nach der Brache und nach mehrjähriger Kultur, sowie unter einigen Gramineenfuttergräsern. Die Bodenproben wurden aus einer Tiefe von 3—5, 8—10 und 18—20 cm im Sommer (Mitte Juni) und im Herbst (Mitte September) genommen, wobei die Pilzmenge auf Agar mit Glukose bestimmt wurde. Dieselbe war in allen Fällen bedeutend und schwankte in Grenzen von 180—230 000/g Boden. Es wurden folgende Pilzarten gefunden: Penicillium (50% der gesamten Pilzmenge), Cladosporium, Fusarium, Alternaria, Bothrytis, Aspergillus u. a. Die Pilzmenge verminderte sich mit der Tiefe, in der die Bodenproben entnommen waren; auch die im Herbst untersuchten Bodenproben wiesen geringere Pilzmenge auf als die im Sommer untersuchten. Auf den Parzellen unter Sommerung (Weizen) nach mehrjähriger Kultur gehörten alle Fusariumarten zu Fus. oxysporium und Fus. elegans; auch auf den Parzellen unter Gramineengräsern betrug die Menge dieser Fusariumarten ca. 83% der gesamten Fusariummenge. Dagegen waren Fus. oxysporium und Fus. elegans auf den Parzellen in der Brache sowie auf denen unter Weizen nach längerer Brache nur wenig vertreten, so daß Verf. zu den Schlußfolgerungen kommt, daß sich diese Fusariumarten eben bei längerer Bodenkultur stark vermehren und das Abwelken der Gramineen, das auf diesen Feldern oft beobachtet wurde, verursachen. M. Gordienko (Berlin).

Meyer, R., Zur Bestimmung der Mikroorganismen auf den Cholodnyschen Bodenplatten. (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 461—470.)

Das Cholodnysche Bodenplattenverfahren wurde in der Weise ausgebaut, daß der Boden zuvor sterilisiert und dann mit einer Reinkultur geimpft wurde. B. mycoides und subtilis wuchsen dabei nicht; es zeigten sich Degenerationsformen auf den Platten; normales (bezogen auf das Aussehen der Reinkultur) Wachstum zeigte sich erst, wenn dem Boden etwas Bouillon zugesetzt wurde. Anaerober Cellulosezersetzer und ein weißer Aktinomycet erschienen im sterilisierten Boden in etwas anderer Wuchsform. Azotobacter endlich und aerober Cellulosezersetzer sehen dort und in Reinkultur gleich aus.

B. mycoides degeneriert auch, wenn er in Mischkultur mit den anderen Mikroorganismen im sterilisierten Boden gezogen wurde. Der Verf. glaubt, daß sein synthetisches Verfahren weitere Unterlagen zur Beurteilung des Zustandes des natürlichen Bodens geben dürfte.

Rippel (Göttingen).

Brussoff, A., Ein kalkfällendes Stäbchen und ein eisen- und kieselsäurespeichernder Kokkus als Gesteinsbildner. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 471—474.)

Verf. stellt fest, daß die rostfarbene Schicht des „Landesbades" Aachen-Burtscheid von 2 Bakterien gebildet wird, von einem eisen- und kieselsäurespeichernden Kokkus und einem kalkfällenden Stäbchen. Kultur der Mikroorganismen gelang nicht. Rippel (Göttingen).

Koschkin, M. L. und Spektor, E. M., Die Bedeutung des Ammoniaks für das Chlorbindungsvermögen des Wassers. VI. Mitteilung: Einige Daten über den Chemismus des Chlorbindungsvermögens von präammoni-

siertem Wasser. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1936. S. 742—751.)

Es wurde eine Reihe von mineralischen und organischen Substanzen auf ihr Chlorbindungsvermögen geprüft. Die Stoffe können in 3 Gruppen aufgeteilt werden. Gruppe 1: Substanzen mit starker Herabsetzung des Chlorbindungsvermögens bei Anwesenheit von Ammoniak (Quotient der Herabsetzung des Chlorbindungsvermögens, d. i. das Verhältnis des ohne Ammoniak gebundenen Chlors zur Menge des bei Ammoniak-Gegenwart gebundenen Chlors, beträgt > 2). Hierher gehören Nitrite, Heuabsud (2,3), gewisse ungesättigte Verbindungen der Fettreihe (3,7—5,0), Benzolderivate (10,3—26,9), Aminosäuren (8,8—32,0). Gruppe 2: Substanzen mit verhältnismäßig geringem Chlorbindungsvermögen, das durch Ammoniak nur wenig herabgesetzt wird (Fleischwasser, Bouillon, Milch, Gelatine). Quotient bis 2,0. Die hierher gehörigen Substanzen besitzen die Fähigkeit, das Chlorbindungsvermögen der Substanzen aus Gruppe 1 herabzusetzen. In dieser Hinsicht wirken sie analog dem Ammoniak. Gruppe 3: Substanzen, die höchstens Spuren von Chlor binden (Harnstoff, Glukose, Kreatinin); Quotient = 0. Beimischung solcher Stoffe zu Substanzen aus Gruppe 1 und 2 ist ohne Einfluß auf deren Chlorbindungsvermögen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Baier, C. R., Studien zur Hydrobakteriologie stehender Binnengewässer. Inaug.-Diss. Kiel. (Arch. f. Hydrobiologie. Bd. 29. 1935. S. 183—264.)

Über die Bakterienflora der Binnengewässer sind bis heute nur die elementarsten Tatsachen bekannt und wissenschaftlich belegt. Verf. gibt einen umfassenden Überblick über die bisherige Literatur und beleuchtet kritisch die Aufgaben, die der Hydrobakteriologie gesetzt sind. — Im einzelnen untersuchte Verf. 5 Teiche und verglich die physikalisch-chemischen und bakteriologischen Untersuchungen. Keimzählungen, auch solche verschiedener physiologischer Gruppen (Anaerobe, Oligoorganotolerante, Peptonisierende, Säurebildner) und direkte Aktivitätsbestimmungen wurden ausgeführt. Verf. konnte z. T. deutliche Wechselbeziehungen zwischen Chemismus des Wassers, Gesamtkeimzahl und Keimzahlen und Aktivität verschiedener physiologischer Gruppen feststellen. Die vorkommenden Bakterienarten wurden bestimmt. — Das Fehlen und Nichtkeimen von Schimmelpilzsporen im Wasser und Schlamm konnte Verf. auf Hemmung infolge Sauerstoffzehrung durch Bakterien sowie auf Nahrungsmangel und Zerfall der Sporen und Keimschläuche zurückführen. — Sommerlich stinkende Fäulnis des „Kleinen Kiel“ führt Verf. auf Sulfatreduktion zurück. — An Hand der Literatur und eigener Untersuchungen untersuchte Verf. die Faktoren, die die Zahl und Vermehrung der Wasserbakterien regulieren. — Die Sedimentation, die als wichtiger keimsenkender Faktor erkannt wurde, bedingt u. a. die sommerliche Keimzahlschichtung in Seen, ihr Fehlen, das Ansteigen der Keimzahl in geschöpften Wasserproben. — Zahlreiche Wassertiere wurden auf ihre Fähigkeit, die Bakterien des Wassers, Schlammes und Bewuchses als Nahrung aufzunehmen, untersucht.

Meewes (Kiel).

Liebmann, H., Auftreten, Verhalten und Bedeutung der Protozoen bei der Selbstreinigung stehenden Abwassers. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 29—62.)

Die Protozoen sind am Vorgang der Selbstreinigung stehenden Abwassers nicht beteiligt. Der Abbau der organischen Substanzen beruht auf rein bakterieller Tätigkeit: Abwasser, durch ½ stünd. Erhitzen auf 56° protozoensteril gemacht, faulte im Becken wie im Zylinder nach einer anfänglichen Erholungspause normal durch, ohne daß Protozoen auftraten.

In flacher Schicht geht die Selbstreinigung bedeutend schneller vor sich als bei hoher Wassersäule.

Als aerob bekannte Ciliaten vermochten in sauerstofffreiem und schwefelwasserstoffhaltigem Wasser mehrere Tage zu leben. Der Schwellenwert für das Leben der untersuchten Ciliaten lag bei 18 mg H_2S/1 l Wasser; bei höherem Schwefelwasserstoffgehalt gingen die Ciliaten in spätestens 24 Std. zugrunde.

Bei Colpidium colpoda wurde in sauerstofffreiem Wasser bei Anwesenheit von Schwefelwasserstoff eine fakultative Symbiose mit grünen Schwefelbakterien (Chlorobakterien) festgestellt, die dem Infusor das Leben in schwefelwasserstoffhaltigem Wasser ermöglichte.

Der Gehalt der atmosphärischen Luft an Protozoencysten ist im allgemeinen sehr gering. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Bach, H., Streifblicke auf neuere Bestrebungen im Gebiete der Abwasserbeseitigung. (Chemiker-Zeitung. Bd. 59. 1935. S. 861—863.)

In Amerika machte sich in den letzten Jahren — vielleicht von interessierter Seite hervorgerufen — eine Strömung geltend, die biologischen Reinigungsverfahren durch chemisch-mechanische Arbeitsweisen zu ersetzen, wobei darauf hingewiesen wurde, daß die Fällungsverfahren, mit denen es früher bekanntlich nicht gelang, ein fäulnisunfähiges Klärwasser zu erzielen, inzwischen wesentlich vervollkommnet worden seien. Die Mängel dieser Verfahren, die seinerzeit zur biologischen Nachreinigung Anlaß gaben, sind aber auch jetzt noch nicht behoben: auch die sinnreichsten mechanischen Hilfseinrichtungen vermögen die eiweißartigen Organica eines Abwassers nicht entscheidend zu beseitigen, außerdem wird durch jedes Fällungsverfahren der Klärschlamm in seiner Beschaffenheit verschlechtert.

In der biologischen Abwasserreinigung sind in den letzten Jahren weitere Fortschritte gemacht worden, die sich auf die Sauerstoffwirtschaft, die Blähschlammfrage, die Vorgänge im Tropfkörper u. a. m. beziehen. In der Klärschlammbehandlung scheint in bezug auf das Ausfaulverfahren ein gewisser Höhepunkt erreicht zu sein. Die Schwierigkeiten der biologischen Reinigung der Abwässer der Zuckerfabriken während der immer kürzer werdenden Kampagne werden jetzt dadurch umgangen, daß man diese Abwässer lediglich mechanisch klärt, chlort und wieder verwendet. Heuß (Berlin).

Damm, H. und Baier, C. R., Über die Vorgänge bei der biologischen Abwasserreinigung. (Molkerei-Zeitg. Hildesheim. Nr. 97. 1935. S. 2695—2697, 8 Abb.)

Bei der biologischen Abwasserreinigung durch eine Belebtschlammanlage spielen eine hervorragende Rolle: Eiweiß spaltende und Kohlehydrate zersetzende Bakterien sowie die verschiedensten Protozoen (Flagellaten, Rhizopoden, Suktorien, Amöben, Ciliaten und Nematoden). Ungelöste organische Stoffe des Abwassers werden von bestimmten Bakterienarten zum Teil gelöst. Die vollständige Mineralisierung erfolgt durch andere Bakteriengruppen. Etwa vorhandene Protozoen-Cysten werden durch die Anwesenheit der Bakterien gereizt, wieder in den vegetativen Zustand überzugehen. Die Bakterien dienen der Abwasser-Mikrofauna neben den festen und gelösten Stoffen des Abwassers als Nahrung. Ist die Belebtschlammanlage stark mit organischer Substanz belastet, so verschwinden die Bakterien und es treten Spirillen, Spirochäten und Flagellaten auf. Werden sehr große

Mengen Molke hineingebracht, so wird auch die Mikrofauna infolge Bildung von Milchsäure stark zurückgedrängt. Meewes (Kiel).

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz im allgemeinen.

Saatgutbeize. **Schering-Kahlbaum**, Berlin. DRP. 626177, Kl. 45 l.

Man verwendet als Saatgutbeize kernmerkurierte Xylenole. Die Beize dient besonders zur Bekämpfung von Fusarium. Schütz (Berlin).

Mittel zur Pflanzenschädlingsbekämpfung. Chemische Fabrik in Billwärder vorm. **Hell & Sthamer A.-G.**, Hamburg-Billbrook. (Erf.: Dr. H. Geller.) DRP. 627 144, Kl. 45 l.

Man bringt Thioharnstoff mit Kupfersalzen und gegebenenfalls arseniger oder Arsensäure in Wasser zur Reaktion und führt den entstandenen Niederschlag in Pulverform über. Die so hergestellten Verbindungen übertreffen die Wirkung hochprozentiger Arsengifte, wie Blei- und Calciumarsenat. Pflanzenschädigungen sind nicht beobachtet worden. Die Produkte haben eine ausgezeichnete Haftfähigkeit und in Wasser aufgeschwemmt, eine gute Schwebefähigkeit. Schütz (Berlin).

Bekämpfung von tierischen Schädlingen. **Hans Heinrich-Hütte** G. m. b. H., Langelsheim (Harz). (Erf.: Dr. O. Roder.) DRP. 627 200, Kl. 45 l.

Es wurde gefunden, daß im wesentlichen aus Sulfiden des Aluminiums und Siliciums bestehende Produkte, die durch Erhitzen von Gemischen oder Legierungen dieser Stoffe mit Schwefel erhalten werden, gute Mittel zur Vertilgung von z. B. Ratten, Feldmäusen und Wespen sind. Die Mittel werden in Form von Patronen mit feuchtigkeitsdurchlässiger Umhüllung in die Erdlöcher und dergleichen der Schädlinge eingebracht oder besser in Pulverform eingeblasen. Durch feinere oder gröbere Körnung läßt sich auch die Einwirkungszeit regeln. Schütz (Berlin).

Bekämpfung von Pflanzenschädlingen. **I. G. Farbenindustrie** A.-G., Frankfurt a. M. DRP. 624 899, Kl. 45 l.

Man verwendet Aldehyde der Fettreihe mit mehr als 5 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls ein Gemisch mit sonstigen für die Schädlingsbekämpfung geeigneten Mitteln. Man kann die Aldehyde z. B. in Form von Lösungen oder Emulsionen benutzen. Ein Gemisch von Dodecyl- oder Oleylaldehyd mit Nikotin hat sich zur Insektenbekämpfung im Wein- und Obstbau bewährt. Die Pflanzenteile werden dabei nicht geschädigt. Schütz (Berlin).

Bekämpfung von Schädlingen in geschlossenen Räumen. **I. G. Farbenindustrie** A.-G., Frankfurt a. M. (Erf.: Dr. K. Brodersen und Dr. M. Quaedvlieg, Dessau.) DRP. 625 865, Kl. 45 l, Zus. zu DRP. 597 554.

Man verwendet durch Wasser zersetzbare Doppelverbindungen von anorganischen Halogeniden mit anderen für die Schädlingsbekämpfung bekannten, leicht flüchtigen organischen Verbindungen. Durch geeignete Kombination gelingt es, Mittel herzustellen, die gleichzeitig bakterizid und insektizid wirken. So kann man z. B. chemische aus Diäthyläther und Formaldehyd- bzw. Schwefelkohlenstoff-Additionsverbindungen zur Anwendung bringen, und erzielt gleichzeitig eine fungizide, bakterizide und insektizide Wirkung. Schütz (Berlin).

Saatguttrockenbeize. **Schering-Kahlbaum** A.-G., Berlin. DRP. 623 468, Kl. 45 l.

Im Nickelammoniumsulfat wurde ein Mittel gefunden, mittels dessen es gelingt, Saatgutkrankheiten, insbesondere das Fusarium beim Roggensaatgut restlos zu bekämpfen. Das Mittel ist für Menschen und Tiere unschädlich. Schütz (Berlin).

Bekämpfung von Rostkrankheiten an Kulturpflanzen. **I. G. Farbenindustrie** A.-G., Frankfurt a. M. (Erf.: Dr. A. Steindorff, Dr. R. Krämer, Dr. W. Staudermann und Dr. M. Erlenbach, Frankfurt a. M.-Höchst.) DRP. 617 899, Kl. 45 l.

Man verwendet die Amide aromatischer Sulfosäuren oder deren Substitutionsprodukte oder Derivate in Mischung mit Düngemitteln und / oder indifferenten Streckmitteln. Irgendwelche Störungen des Pflanzenwuchses selbst treten dabei nicht auf. Schütz (Berlin).

Schädigungen der Pflanzen durch physikalische, chemische und physiologische Einflüsse.

Doerell, E. G., Borax bzw. Borax-Superphosphat als Schutzmittel gegen Herz- und Trockenfäule der Rüben (Sommer 1935). (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 599—600.)

Verf. erzielte mit 20 kg Borax je ha, das mit 200 kg Superphosphat gut gemischt und neben einer entsprechenden Kalidüngung als Grunddüngung vor dem Anbau gegeben wurde, gute Erfolge. Herz- und Trockenfäule trat in diesem Falle nicht auf. Wurden dagegen 10 kg Bor je ha in flüssiger Form verspritzt, so unterblieb der Erfolg. Die Ursache liegt nach Meinung des Verf.s daran, daß die Anwendung zu spät erfolgte und die verabreichte Menge in Trockenlagen auch nicht in den Bereich der Wurzeln gelangen konnte. Bedenken wegen einer schädigenden Nachwirkung des Bors dürften bei Verwendung von Bor-Superphosphat-Mischdünger nicht bestehen. Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Gennep, V. C. van, De Symptomen van Physiologische Ziekten van Lupinus luteus L. [Die Symptome von physiologischen Krankheiten von Lupinus luteus L.] Dissertation. Baarn (Hollandia Drukkerij) 1936. 90 S., mit 8 Tafeln.

Es wurde das Verhalten von Lupinus luteus untersucht in Wasserkulturen mit v. d. Crone-Nährlösung, sowohl bei Mangel wie bei Überschuß der folgenden Elemente: Ca, P, Fe, K, Mg, N, B, Mn, Al Zn und Cu.

Calcium-Mangel an Ca ergibt kleine Pflanzen mit Wurzeln, deren Spitzen sich bald rotbraun verfärben und dann absterben. Die meist kurzen und dünnen Seitenwurzeln weisen rotbraune Ringe auf. Schließlich werden alle Wurzeln schwarz. Die älteren Blätter weisen anfangs einige Chlorose auf, welche aber bald wieder verschwindet. Überschuß von $CaCO_3$ verursacht bald hochgradige Chlorose, nur die Hauptnerven bleiben noch einige Zeit grün. Schließlich verschrumpfen die Blätter, die Stengelspitzen trocknen ein und die Pflanzen sterben ab. Die Wurzeln gleichen denen von Pflanzen mit Eisenmangel. Indem man den p_H der Nährlösung auf 6,5 erhält, kann die durch $CaCO_3$ verursachte Chlorose verhindert werden. $CuSO_4$ und $Ca_3(PO_4)_2$ im Überschuß sind bei demselben p_H weniger schädlich wie $CaCO_3$. Hier kann das Auftreten der Chlorose durch Erhöhung der Phosphat- oder Kali-Konzentration nicht verhindert werden, die Krankheitssymptome nehmen zu und die Pflanzen sterben schneller ab. Wird die $Fe_3(PO_4)_2$-Konzentration der Lösung erhöht oder Eisenzitrat zugefügt, so entsteht keine Chlorose. Obige Versuche erbringen also den Beweis, daß „Kalkchlorose" eine echte Eisenchlorose ist.

Phosphor. Abwesenheit von P ergibt unregelmäßige violettbraune Flecken, während die Blätter dunkelblaugrün werden. Die Wurzelentwicklung ist schlecht, die Seitenwurzeln sind lang und dünn. Anwesenheit von löslichen Phosphaten veranlaßt das Entstehen von hochgradig chlorotischen Pflanzen, welche unter Symptomen von Eisenmangel absterben. Mehr Eisen als Eisenchlorid zugefügt, hemmt die Chlorose, durch Eisenzitrat kann sie behoben werden. Man hat hier also mit einer echten Eisenchlorose zu tun.

Eisen. Bei Abwesenheit von Eisen wachsen die Pflanzen nur mäßig, die Blätter werden chlorotisch und nehmen eine gelbe Farbe an; schließlich verschrumpfen sie und fallen ab, während die Stengelspitzen vertrocknen. Die Wurzeln entwickeln sich spärlich und sind weiß. Die Seitenwurzeln sind meist kurz und dünn, einzelne erreichen eine abnormale Länge. Bei Überschuß von Eisenphosphat ist das Wachstum ebenfalls schlecht, die Pflanzen sterben ab. Die Wurzeln sind braun und schlecht entwickelt. Ein Teil der Pflanzen bringt es bis zur Blüte, bleibt aber kümmerlich; hier sind die Wurzeln besser entwickelt, von dunkelgrauer Farbe mit langen, dünnen Seitenwurzeln.

Kalium. Bei Abwesenheit von Kalium bekommen die Pflanzen eine gedrungene Gestalt mit braunen Stengelspitzen und braunen Blättern. Schließlich bleibt an der Spitze ein Kranz von jungen Blättern übrig, deren Blattspitzen stark nach unten umgebogen sind. Schlechte Wurzelentwicklung mit kurzen, dünnen Seitenwurzeln. Bei Erhöhung der K_2HPO_4-Konzentration sterben die Pflanzen bald ab unter Symptomen von Eisenmangel. KCl und K_2SO_4 im Überschuß wirken weniger schädlich.

Magnesium. Bei Abwesenheit von Magnesium bekommen die Blätter bald hellgelbe Flecken, welche sich schnell über die ganze Blattspreite ausbreiten. Die Blätter verschrumpfen und fallen ab, die Stengelspitzen vertrocknen und die Pflanzen sterben ab. Die Wurzeln sind schlecht gewachsen, weiß mit kurzen, dünnen, spärlichen Seitenwurzeln. Bei Erhöhung der Mg-Konzentration treten keine Krankheitssypmtome auf. Zufügung von $MgCO_3$ jedoch bewirkt Absterben der Pflanzen durch Eisenmangel.

Stickstoff. Bei Stickstoffmangel werden die Blätter gelbgrün, die Stengel und Hauptnerven dunkelrot. Schließlich werden die Blätter auch dunkelrot und verschrumpfen. Die Pflanzen bleiben klein und wachsen schlecht. Die Wurzeln sind dünn, mit spärlichen, langen Seitenwurzeln. Wird Stickstoff als NH_4NO_3, NH_4Cl oder $(NH_4)_2PO_4$ gegeben, so werden die Wurzeln stark geschädigt und die Pflanzen sterben ab. Bei $NaNO_3$ ist das Wachstum gering, mit hellgrünen Blättern und weißen Wurzeln. Bei $Ca(NO_3)_2$ zeigen die Pflanzen bald Eisenmangel.

Bor. Abwesenheit von Bor verursacht schwarze Wurzelspitzen, und kurze und dicke Seitenwurzeln. Später werden dieselben schwarz und schleimig. Die Blätter bekommen unregelmäßige gelbe Flecken und verwelken, die Stengelspitzen vertrocknen, die Pflanzen sterben ab. Zeitige Zuführung von Bor hat die fast vollständige Erholung der Pflanzen zur Folge. Bei Überschuß von Bor werden die Hauptnerven gelb, die Blätter vertrocknen und fallen ab. Schließlich vertrocknen die Stengelspitzen und die Pflanzen sterben ab.

Mangan, Aluminium und Zink. Bei Zufügung von Mn, Al und Zn in verschiedenen Zusammensetzungen ohne Bor sterben die Pflanzen bald ab. Boi Manganmangel treten gelbgrüne Flecken zwischen den Nerven auf und golbgrüne Blattränder. Zufügung von 40 mg $MnSO_4$/L macht sich kaum bemerkbar.

Bei Zufügung von Bor und Aluminium ist das Wachstum bessor wie mit Bor allein. Wird außerdem Mn zugefügt, so verschwindet der günstige Einfluß dos Aluminiums.

Symptome von Al- und Zn-Mangel wurden nicht beobachtet.

Kupfer. Bei Kupfermangel werden die älteren Blätter nach einiger Zeit golbrandig mit gelben Flecken auf der Blattspreite. Die Pflanzen entwickeln sich mäßig, die Wurzeln zeigen keine Abweichungen. Bei zunehmender $CuSO_4$-Konzentration wird die Wurzelentwicklung immer schlechter, bei 10 mg/L werden die Wurzeln schwarz und die Pflanzen sterben ab.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Spencer, E. L., Studies on frenching tobacco. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 1067—1084, 3 figs.)

Die als „Frenching" (Gelbsucht) bezeichnete Erkrankung trat stark an Nicotiana alata, N. langsdorffii, N. longiflora, N. rustica, N. sanderae, N. sylvestris und an 16 Varietäten von N. tabaccum auf, an weiteren 16 untersuchten Spezies von Nico-

tiana jedoch nicht. Weiter wurde die Krankheit an Datura stramonium, Lycopersicon esculentum und Petunia hybrida beobachtet. Erreger konnten an den erkrankten Pflanzen nicht ermittelt werden. Im Gewächshaus konnte die Krankheit durch Kompostierung des Bodens, durch Zusatz von Torf, durch wiederholte Gaben von Stickstoffdünger und durch mehrmalige Anwendung einer verdünnten Lösung von Kupfer- oder Aluminiumsulfat beseitigt werden. Bei Mangelversuchen mit verschiedenen für das Wachstum wichtigen Stoffen wie Stickstoff, Phosphor, Kalium, Kalzium, Magnesium und Schwefelverbindungen zeigte sich die Krankheit nicht. Die Krankheit trat an Pflanzen in Sand auf, die täglich mit wäßrigem Ackerbodenextrakt begossen wurden, und solchen, die in Sand wuchsen, dem auf 2000 Teile 1 Teil Ackerboden zugesetzt war. Außerdem an Sämlingen in Sand, durch Zufügen von Wasser aus einer tiefen Quelle. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Berjosowa, E. und Sawtschenkowa, M., Bakterielle Krankheiten des Flachses. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 103—120.) [Russisch.]

Es gibt eine Anzahl flachsschädigender Bakterien, die in 3 Gruppen eingeteilt werden können. Zur ersten Gruppe, die von Verff. am eingehendsten untersucht worden ist, gehören Bakterien, die Erkrankungen des Flachses hervorrufen. Es sind 0,4—1 × 1,5—5 μ große, bewegliche und sporenbildende Stäbchen. Auf Bouillon bilden sie Schleim, rufen Milchgerinnung und Gelatineverflüssigung hervor, wachsen auf stickstofffreien Nährböden, assimilieren Pepton und schwefelsaures Ammonium, jedoch kein Asparagin, vergären Kohlehydrate, hydrolisieren Stärke und sind fakultativ anaerob. Ihre optimale Wachstumstemperatur beträgt 20° C. In diese Gruppe gehören einige Stämme, die sich voneinander durch ihre physiologischen Eigenschaften und verschiedene Virulenz unterscheiden. Auf Nährböden mit Maismehl rufen die Bakterien Azeton-Äthylalkohol-Gärung hervor, wodurch sie sich, obwohl nur in gewissem Maße, dem B. macerans nähern. Bei Bakteriosen junger Leinpflanzen lassen sich zwei Erkrankungstypen unterscheiden. 1. Am Ende der Wurzel entsteht ein Flecken von hellgelber bis dunkelroter Farbe, der sich zuweilen auf bedeutende Strecken verbreitet. An der Biegung der Keimblätter sieht man Wunden von orangegelber, auf den Kleimblättern selbst trockene Wundstellen von brauner Farbe. Die Erkrankung ist der von Colletotrichum Lini hervorgerufenen ähnlich. Verff. betonen diesen Umstand, indem sich bei typischor Anthraknose häufig keine Pilze isolieren ließen, während zahlreiche Bakterien vorhanden waren (? Der Herausgeber).

2. Die zweite Erkrankungsart äußert sich in der Reduktion des Wurzelsystems. Die Entwicklung der Pflanze wird gehemmt, häufig vergilbt dieselbe und stirbt ab. Zwecks Untersuchung der pathogenen Eigenschaften der Bakterien wurden Leinsamen mit Bakterienemulsion infiziert und darauf zum Keimen gebracht. Diese Versuche ergaben 93% infizierter Samen. Es wurde auch Keimen der Samen auf synthetischen Nährböden mit Agar, die phytopathogene Bakterien enthielten, untersucht. In diesem Fall traten beide Erkrankungstypen auf und aus den erkrankten Teilen der Pflanzen ließen sich die Bakterien reisolieren. Je größer die Dosis der Infektion, um so geringer war die Halm- und Wurzellänge des Flachses, jedoch trat die Wachstumshemmung des Wurzelsystems stärker auf, als die des Halmsystems. Bei günstigen Bedingungen können sich die erkrankten Pflanzen infolge Bildung eines neuen Halmes und neuen Wurzelsystems erholen.

Die Aussaat infizierter Keime beeinträchtigt die Halmernte bis um 40%, die Samenernte bis 18%. Bei schwacher Infizierung kann die Samenernte, zuweilen auch die Halmernte, infolge größerer Samenkapseln und größeren Halmdurchmessers, höher sein, als bei gesunden Pflanzen, jedoch ist der Flachs in diesem Fall minderwertig. Verff. infizierten verschiedene Bodenproben mit Bakterien und fanden, daß Bodeninfizierung die Ernte in stärkerem Maße herabsetzt, als Saatgutinfektion. Diese Wirkung tritt auf Sandboden stärker hervor, als auf Böden, die reich an organischer Substanz sind.

Zur zweiten Gruppe der bakteriellen Flachskrankheiten gehören die Samenbakteriosen, die das Keimen der Saat beeinträchtigen. Die Bakterien vermehren sich auf

der Oberfläche des Samenhäutchens, bilden Schleim und hemmen die Keimfähigkeit um 28%.

Die dritte Erkrankungsgruppe entsteht durch Stäbchen, die keine Sporen tragen und anormale Entwicklung des Wurzelsystems ohne Gewebeschädigung hervorrufen. Ob diese Erkrankungen als Bakteriosen anzusehen sind, ist noch fraglich. Es wäre möglich, daß diese Bakterien Übergangsformen zwischen typischen Parasiten und Bodenmikroorganismen, unter denen zweifellos einige Arten die Flachsernte schädigen, bilden. A. Imšenecki (Moskau).

Pal, B. P., and Nath, P., Phyllody: A possible virus disease of Sesamum. (Indian Journ. of Agric. Sc. Vol. 5. 1935. H. 4. p. 517—522, 4 Taf.)

An Sesampflanzen wurde in Indien eine ausgeprägte Phyllodie beobachtet. Sämtliche Blütenorgane mit Ausnahme der Staubgefäße zeigten eine typische Verlaubung. Besondere Düngemaßnahmen wie auch Änderung der Luftfeuchtigkeit vermochten keine Veränderung der Symptome hervorzurufen. Wohl aber wirkte frühe Aussaat und die damit verbundene längere Vegetationszeit begünstigend auf die Ausbildung der Phyllodie. Subepidermale Stengelinjektionen an gesunden Pflanzen mit Saft phylloider Pflanzen verliefen ergebnislos. Jedoch war es möglich, die Erscheinungen der Phyllodie durch Stengelpfropfungen wechselseitig zu übertragen. Verf. spricht die Vermutung aus, daß es sich bei der Phyllomorphie um eine Viruskrankheit handeln könnte. Bärner (Berlin-Dahlem).

Roland, G., Onderzoek van de vergelingsziekte van de biet met enkele opmerkingen over de mozaikziekte. [Untersuchung der Vergilbungskrankheit der Rübe, sowie einige Bemerkungen zur Mosaikkrankheit.] (T. o. Pl. 1936. Heft 3. S. 54—66, mit 4 Tafeln.)

Verf. weist nach, daß die Vergilbungskrankheit der Futterrübe sowohl durch die Blattlaus Myzus persicae, wie durch die Blattlaus Aphis fabae übertragen werden kann, wobei das Auftreten der Symptome der Krankheit durch intensives Licht und trockene Luft beschleunigt wird. Das Virus überwintert sowohl in den Wurzeln von Beta vulgaris wie von winterharten Sorten von Beta maritima. Eine sekundäre Erscheinung bei kranken Pflanzen ist bisweilen das Schwarzwerden der Blätter unter Einfluß eines Pilzes, der von Kirchner als Sporidesmium putrefaciens Fuck., von Bolle als eine Mischung von Alternaria cheiranthi und Cladosporium herbarum bestimmt wurde.

Was die Mosaikkrankheit anbetrifft, bestätigt Verf. u. a., daß dieselbe durch die Blattlaus Myzus persicae übertragen werden kann. van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Quanjer, H. M., De vergelingsziekte en de mozaikziekte van de suiker en voederbiet. [Die Vergilbungs- und die Mosaikkrankheit der Zucker- und Futterrübe.] (T. o. Pl. 1936. Heft 3. S. 45—54.)

Verf. bespricht ausführlich das Vorkommen und das Wesen der beiden genannten Krankheiten in Europa und den Vereinigten Staaten und erwähnt die Resultate seiner und anderer Forschungen. van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Riemsdijk, J. F. van, Physiologisch onderzoek van de „Vergelingsziekte" van de voederbieten en de schade door deze ziekte teweeggebracht. [Phy-

siologische Untersuchung der Vergilbungskrankheit und des von dieser Krankheit verursachten Schadens.] (T. o. Pl. 1935. Heft 12. S. 317—324, mit Tabellen.)

Die Vergilbungskrankheit der Futterrübe weist, wie frühere Untersuchungen gelehrt haben, große Ähnlichkeit auf mit der Blattrollkrankheit der Kartoffel. In beiden Fällen ist die Atmung der kranken Blätter ziemlich normal, die Assimilation der kranken Blätter ist gegenüber derjenigen der gesunden Blätter eine geringere, die kranken Blätter sind bei gleicher Oberfläche schwerer und dicker als die gesunden und schließlich tritt in beiden Fällen in den Blättern Stärke-Anhäufung auf. Die Ursache der Stärke-Anhäufung bei Kartoffeln muß nach Thung der gehemmten Assimilation zugeschrieben werden. Für Futterrüben hat Verf. dasselbe durch Versuche wahrscheinlich gemacht. Angenommen werden muß, daß die Vergilbungskrankheit zu den Viruskrankheiten gehört, wie das für die Blattrollkrankheit der Kartoffel schon längst nachgewiesen wurde. Darauf weist auch die Tatsache hin, daß die Vergilbung früher und stärker auftritt, je nachdem die Rüben den Wasserrüben (Saatrüben) näherstehen (de Clercq).

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Oortwijn Botjes, J. G., De stand van het immuniteitsvraagstuk bij virusziekten van de planten. [Der Stand der Immunitätsfrage bei Viruskrankheiten der Pflanzen.] (T. o. Pl. 1936. Heft 1. S. 1—9.)

Mehrere Forscher haben in letzter Zeit nachgewiesen, daß weniger virulente Virusarten aus stark virulenten Säften erhalten werden können und zwar entweder durch Züchten infizierter Pflanzen bei höherer Temperatur (Johnson, Kunkel, Holmes) oder indem man die virulenten Säfte auf andere Pflanzenrassen überträgt (Jensen, Oortwijn Botjes). Die größte Schwierigkeit liegt im Züchten und Isolieren dieser geschwächten Stämme. Sollte dies für die wichtigsten Virusarten gelingen, so eröffnen sich große praktische Perspektiven. Um dies zu erreichen, stehen zwei Wege offen. Erstens kann man nachforschen, wo in der Natur Virusarten vorkommen, welche in einer bestimmten Kartoffelrasse keine nennenswerten Krankheits-Symptome verursachen, deren Anwesenheit dieselbe jedoch gegen schlimmere Viruskrankheiten schützt; zweitens kann man versuchen, aus einem Virus einen abgeschwächten Stamm zu isolieren oder ein vorhandenes Virus abzuschwächen.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Tierische Schädlinge.

Hampp, H., Die rote Spinnmilbe und Versuche zu deren Bekämpfung im Hopfenbau. (Allgem. Brauer- u. Hopfenzeitung. Bd. 76. 1936. S. 9—12.)

Tetranychus (Epitetranychus) althaea v. Haust. verursacht den Kupferbrand der Hopfenpflanze, der das Aussehen schädigt und den Brauwert herabsetzt. Verf. beschreibt die Lebensweise und die Vermehrungsbedingungen dieses gefürchteten Schädlings, sowie die Maßnahmen zu seiner Bekämpfung, bei der eine Reihe von Mitteln ausprobiert wurden.

Pyrethrumpräparate wirken trotz guter Benetzung erst bei hoher Konzentration mittelmäßig gut, sind auch im Preis zu hoch. Derrispräparate ewährten sich nicht. 3proz. Schmierseifenlösung ist sehr gut wirksam,

führt aber an Blüten und Dolden zu Verbrennungen. Tabakextraktlösungen geben auf den Blättern einen häßlichen Überzug. 2proz. Schwefelkalkbrühe wirkt sehr gut und ist vor allem billig, sie ruft aber an der Dolde Verbrennungen hervor. Erysit, ein flüssiges Schwefelpräparat, hat sich sehr gut bewährt und schadet der Pflanze nicht. Verf. empfiehlt als Spritzmittel bis zur Bildung der Dolden eine 2proz. Schwefelkalkbrühe und von da ab eine 1proz. Erysitlösung. Heuß (Berlin).

Zattler, F., Kupferbrandjahre im Hopfenbau. (Allgem. Brauer- und Hopfenzeitg. Bd. 76. 1936. S. 71—74.)

Die für den Hopfenbau unter Umständen so gefährlich werdende Hopfenspinnmilbe, Tetranychus (Epitetranychus) althaeae v. Hanstein, ist in ihren Entwicklungsmöglichkeiten stark von der Witterung abhängig. Das Studium der meteorologischen Verhältnisse in den ausgesprochenen Kupferbrandjahren der Hallertau 1911, 1921, 1934 ermöglichte tiefgehende Einblicke in die Ursachen, die das Aufkommen des Schädlings begünstigen. Zur Charakterisierung der Kupferbrandjahre besonders geeignet erwiesen sich von den meteorologischen Daten:

das Tagesmittel der Lufttemperatur } im Monats-
" " " relativen Luftfeuchtigkeit } durchschnitt
die monatliche Niederschlagsmenge
die Zahl der Tage mit wenigstens 1,00 mm Niederschlag
" " " trüben Tage.

Der Witterung des Monats Mai kommt unverkennbar eine prognostisch verwertbare Bedeutung zu: Jahre mit einer mittleren Tagestemperatur von 13° C oder darüber und einer Niederschlagsmenge von nicht mehr als 50—70 mm sind sehr geeignet für ein starkes und gefährliches Auftreten des Kupferbrandes. Dabei ist es gleichgültig, ob im vorhergehenden Jahr Kupferbrand vorhanden war oder nicht. Andererseits entsteht nach den bisherigen Erfahrungen trotz trockener und warmer Sommermonate kein Kupferbrandjahr, das die Hopfenernte bedroht oder vernichtet, wenn nicht schon der Monat Mai warm und trocken und damit für die erste Entwicklung der Spinnmilbe geeignet war. Heuß (Berlin).

Eller, K., Der Distelfalter, ein Schädling der Sojabohne in Deutschland? (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 378.)

Verf. stellte auf einem 4 ha großen Sojabohnenfeld an der einem Wald abgewandten Seite ein Massenauftreten von Vanessa cardui fest. Die Raupen des Distelfalters hatten die Pflanzen z. T. bis auf den Blattstiel abgefressen. Es konnte aber nicht nachgewiesen werden, ob es sich bei dem Fraß an Sojabohne nur um ein Notfutter handelte, zumal auch in der Nähe stehende Disteln kahlgefressen waren.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Marchner, G., Der Fall „Sojabohne-Distelfalter". (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 415.)

In Erwiderung auf die Ausführungen des vorstehend referierten Aufsatzes wird auf die Polyphagie des Distelfalters hingewiesen und die Vermutung geäußert, daß infolge einer eingetretenen Futterknappheit auch die Sojabohne befallen wurde. Diese Ansicht findet dadurch eine Stütze,

daß der Distelfalter in denjenigen Ländern, die für ihn ein weit günstigeres Klima haben, Sojabohnen bisher nicht befallen haben soll.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Magerstein, V., Zum Befall der Sojabohne durch den Distelfalter. (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 468.)

Unter Bezug auf die beiden oben referierten Aufsätze weist Verf. darauf hin, daß er in der Nähe von Teschen in den Jahren 1903—1912 Kulturversuche mit Sojabohnen angestellt habe, bei denen der Distelfalter mehrfach schädigend auftrat und die Sojabohne vor Disteln und Kletten bevorzugte. Der stärkste Befall, dem ein Drittel der Blätter zum Opfer fiel, wurde in dem trockenen Sommer 1910 beobachtet.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Goodey, T., Observations on a field plot experiment with Anguillulina dipsaci on potatoes. (Journ. of Helminthology. Vol. 13. 1935. p. 91—102.)

Sechsjährige Anbauversuche von Kartoffeln auf demselben Boden ergaben, daß der Befall durch Anguillulina dipsaci unter bestimmten Voraussetzungen eher abnimmt als zunimmt. Eine Auswertung dieser Beobachtung für die Bekämpfung dürfte aber nicht möglich sein, da sämtliche Kartoffelknollen aus dem Boden sorgfältig ausgelesen werden müßten, was praktisch kaum möglich sein wird. Doppelte und vierfache Düngung mit Kaliumsulfat schützten die Knollen nicht vor Schädigung. Nicht befallen wurden Weizen, Gerste, Roggen und Hafer, sowie Mangold, Wasserrübe, Erbsen und Zwiebeln. Die Verbreitung erfolgt wahrscheinlich durch leicht befallene Knollen, die dem Auge entgehen und sich im Pflanzgut befinden. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Goodey, T., Aphelenchoides hodsoni n. sp., a nematode affecting narcissus bulbs and leaves. (Journ. of Helminthology. Vol. 13. 1935. p. 167—172.)

Verf. berichtet über einen neuen in Narzissen gefundenen Nematoden, der auch eine vorzeitige Vergilbung und Schwärzung der Blätter hervorruft. Blattschwellungen treten dabei nicht auf. Der Nematode hat eine gewisse Ähnlichkeit mit Aphelenchoides ritzema-bosi.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Godfrey, G. H., and Scott, C. E., New economic hosts of the stem- and bulb infesting nematode. (Phytopathology. Vol. 25. 1935. p. 1003—1010.)

Als neue Wirtspflanzen des Stockälchens, Anguillulina dipsaci, werden genannt: Bocksbart (Tragopodon porrifolius) und Petersilie (Petrosilenum hortense); im Infektionsversuch wurde auch Sellerie (Apium graveolens) befallen. Die Krankheitserscheinungen äußerten sich bei allen Pflanzen in einem Anschwellen der Blattbasis sowie einer Vergilbung und Wachstumshemmung. Schwer geschädigt wurde vor allem Petersilie, deren fleischige Wurzeln auch nekrotische Stellen zeigen, die sich bis in den Zentralzylinder hinein erstrecken. Ein Übergang dieser Älchenstämme auf Luzerne und Amsinckia intermedia wurde nicht beobachtet. Ebensowenig gelang es, Älchen von diesen Pflanzen auf Sellerie, Knoblauch, Petersilie oder Bocksbart zu übertragen.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Godfrey, G. H., The demonstration of plant-parasitic nematodes in host tissues. (Phytopathology. Vol. 25. 1935. p. 1026—1030.)

Die durch die Behandlung mit Flemmingscher Lösung auftretende Dunkelfärbung bei Nematoden innerhalb des Wirtsgewebes kann durch Eintauchen des Materials in heißes Aceton (80 proz. Lösung in Wasser) behoben werden, das die Nematoden in ihrer Lage sofort abtötet und das Chlorophyll sowie teilweise auch die Lipoide und andere reduzierende Stoffe entfernt. Nach 3—4 Std. wird das Material gewässert und nach weiteren 3 Std. mit Flemmingscher Lösung behandelt. Es folgt dann nochmaliges Wässern, Entwässern mit Alkohol und Aufhellen in Nelkenöl, gegebenenfalls mit anschließendem Einbetten in Kanadabalsam.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Thorne, G., and Price, Ch., The nematode Neotylenchus abulbosus Steiner (Anguillulinidae) as a parasite of sugar-beets. (Proc. Helm. Soc. Washington. Vol. 2. 1935. p. 46—47.)

In Kalifornien trat als neuer beachtenswerter Schädling an Zuckerrüben Neotylenchus abulbosus auf, der den Rübenkörper befällt. Das erkrankte Gewebe ging sehr schnell in Fäulnis über. Auf einer größeren Fläche wurden die Rüben durch den Nematoden völlig vernichtet. Die Krankheit wird als sehr gefährlich für den Zuckerrübenbau angesehen, wenn sie sich weiter ausbreiten sollte. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Oekologie, biologische und chemische Bekämpfung tierischer Schädlinge.

Nitsche, G., Klee, H. und Mayer, K., Zur Bekämpfung der Rübenblattwanze (Piesma quadrata Fieb.). (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. 15. Jahrg. 1935. S. 97—98.)

Um eine erfolgreiche Bekämpfung der Rübenblattwanze mit Fangstreifen durchzuführen, ist es notwendig, den Termin zu kennen, an dem die Wanzen ihre Winterlager im Frühjahr verlassen haben. Infolge der tiefen Temperaturen fand das Verlassen der Quartiere 1934 durch Abwandern statt; erst bei steigenden Temperaturen setzte ein Flug ein. Die gesamte Abwanderung war am 19. Mai praktisch beendet. Eine Eiablage wurde vom 9. Mai bis in den September hinein beobachtet. Ein großer Teil der Eier wurde vermutlich durch die wiederholten Temperaturstürze im Mai vernichtet. Auf Grund von Besichtigungen konnte ein zusammenhängendes Verbreitungsgebiet festgestellt werden, das sich über den nördlichen Teil der Provinz Schlesien, ferner über Teile von Sachsen (Provinz und Freistaat), Kurmark und Grenzmark erstreckt. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Speyer, Coccinelliden als Blattlausfeinde. (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. 15. Jahrg. 1935. S. 83.)

Verf. weist darauf hin, daß Marienkäfer beachtenswerte Feinde der Blutlaus sind. Wenn bei stärkerem Auftreten von Blatt- und Blutläusen eine besondere Schonung der Marienkäfer notwendig erscheint, sind bei der Winterspritzung die sog. Baumspritzmittel mit und ohne Zusatz von Kupferkalkbrühe zu meiden, während Obstbaumkarbolineum und Schwefelkalkbrühe mehr oder weniger harmlos sind. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Müller-Böhme, H., Schädlichkeit und Bekämpfung der „Großen Wühlmaus“. (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 527.)

Der Kampf gegen die Wühlmaus ist im Herbst in verstärktem Maße durchzuführen. Als Bekämpfungsmittel werden Fallen und Giftköder (Delizia-Rattekal und Zeliopaste) empfohlen. Um Obstbäume zu schützen, muß der ganze Wurzelballen beim Pflanzen mit engmaschigem Drahtgitter umgeben werden. Einzäunen bedrohter Grundstücke, Einlegen von Dornen oder Glasscherben in den Boden oder Anpflanzen von Wolfsmilch (Euphorbia lathyris) haben sich als völlig wirkungslos erwiesen.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Fehringer, O., Hartgas als neues Rattenbekämpfungsmittel. (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 468.)

Günstige Erfolge hatten Versuche mit Hartgas (fester Kohlensäure), das möglichst gleichzeitig in alle Löcher eines Rattenbaues gegeben wird. Man rechnet je Loch etwa $^1/_8$ Liter. Nach dem Einfüllen des Mittels sind die Öffnungen durch Festtreten der Erde luftdicht abzuschließen.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Verschiedenes.

Breit, E., Studien über die Darmflora des Menschen. A. Beitrag zur Kenntnis des Bct. bifidum. B. Beeinflussung der Darmflora. 1. durch Einnehmen von Salzsäure, 2. durch Genuß von Zellulosemehl. Inaug.-Diss. Kiel. 1935. 36 S.

Verf. bestätigt das streng anaerobe Wachstum und das häufige, oft sehr starke Verzweigtsein von Bact. bifidum auf den Laboratoriumsnährböden. Es gelang mit Hilfe der Hennebergschen Deckglas-Agarmethode, Bact. bifidum im Stuhle von 34 Erwachsenen zu 79% nachzuweisen. Das bisherige Mißglücken dieses Nachweises führt Verf. auf die sehr erschwerten Isolierungsmöglichkeiten zurück. Der Nachweis gelingt nur, wenn Bact. bifidum in unbedingter zahlenmäßiger Überlegenheit vorhanden ist. Eine solche Anreicherung gelang nicht in vitro, wohl aber bei manchen Personen im Darme selbst nach starkem Milch- und Milchzuckergenuß. Das Zustandekommen einer Bifidusflora im Säuglingsdarm ist unbedingt von dem Vorhandensein des Bakteriums im Darm oder der Vagina bei der Mutter zur Zeit der Geburt abhängig. Es scheint Verf. berechtigt, Bact. bifidum den Corynebakterien zuzuordnen. — Durch Genuß von Salzsäure konnte Beeinflussung der Darmflora zugunsten der Milchsäurebakterien festgestellt werden, jedoch nur vorübergehend wegen der Gewöhnung des Körpers an die Säure. Eine Bekämpfung von Fäulnisbakterien u. dgl. durch Genuß von lebenden Milchsäurebakterien ist daher geeigneter. An Super- und Anazidität Erkrankte haben nur eine geringfügig voneinander abweichende Darmflora.

Bei Genuß von durch Prof. Herbst hergestelltem Holzmehl konnte eine Verminderung der Fäulnisbakterien festgestellt und eine Anregung der Darmperistaltik beobachtet werden. Die Versuchspersonen nahmen während der 12tägigen Versuchsdauer nichts an ihrem Körpergewicht ab. Ein größerer Genuß als 100 g Holzmehl pro Tag dürfte jedoch wegen seines unangenehmen Geschmackes recht beschwerlich sein. Den Rückgang der Fäulnisbakterien führt Verf. auf den geringen Wassergehalt der Fäzes zurück sowie auf die angeregte Peristaltik, die im Darm nur eine kürzere Verweildauer gestattet. Zudem scheint es den Fäulnisbakterien an Nährstoffen zu mangeln, da diese nur in geringem Umfange vorhanden sind und vom Körper selbst besser ausgenutzt werden.

Meewes (Kiel).

Wertheim, P., Über die Infusorienfauna im Magen von Bos taurus L. (Ann. Mus. Zool. Polon. T. 10 13. 1934 5. p. 201—266.)

Es wurden 36 im Schlachthaus geschlachtete Rinder auf den Infusoriengehalt ihres Magens hin untersucht. Die Menge der gefundenen Infusorien und die Verteilung der Gattungen wird in Tabellen dargestellt. Es zeigte sich, daß in jedem Rind sämtliche Infusoriengattungen des Rinder-

magens vorkommen. Schon die Untersuchung eines einzigen Tropfens pflegt das zu zeigen. Neu in diesem Wirt gefunden wurden Entodinium exiguum (sonst im Renntier) und E. furca monolobum.

K. Friederichs.

Schwartz, W., Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. IV. Mitteilung: Der Stand unserer Kenntnisse von den physiologischen Grundlagen der Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 369—460.)

Ein ausführlicher, dankenswerter Sammelbericht über das große Gebiet der tierischen Symbiose mit Mikroorganismen. Es ergaben sich daraus einige allgemeine Gesichtspunkte.

Es zeigt sich eine hohe Anpassung an den Wirt, die mit morphologischen Veränderungen des Symbionten verbunden sein kann. Im übrigen handelt es sich jedoch um saprophytische, weit verbreitete Bakterien und Pilze aus der Umgebung des Tieres. Eine einwandfreie Reinkultur stößt meist auf große Schwierigkeiten.

Die von Buchner angenommenen Beziehungen zwischen Verbreitung der Symbionten und Ernährungsweise des Wirtes dürften weniger durch die Art der Nahrung als durch die Ernährungsweise des Wirtes bedingt sein. Immunbiologische Eigenschaften des Symbionten und Eigentümlichkeiten des immunbiologischen Abwehrapparates des Tieres sind entscheidend für das Eintreten der Symbiose. Diese wird als mutualistisch abgelehnt; der Symbiont ist zunächst ein harmloser Parasit, der nur in einer Anzahl von Fällen für den Wirt unentbehrlich wird. Das alles ist aber im Einzelfalle sehr schwer festzustellen.

Auf Einzelheiten kann hier nicht eingegangen werden; nur sei noch der Symbiosebegriff erwähnt: „Unter Symbiose verstehen wir nur das gesetzmäßige Zusammenleben von mindestens zwei verschiedenartigen Partnern, das mit einer physiologischen Abhängigkeit des einen Partners vom anderen verbunden ist. Zum Wesen der Symbiose gehört ferner, daß beide Partner von verschiedener Größe sind. Wir bezeichnen den größeren Partner als Wirt, den kleineren als Symbionten.“ Rippel (Göttingen).

Uglow, W. und Gan, G., Über neue oligodynamisch wirkende chemische Verbindungen von Silber und Mangan. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 488—500.)

Das von Uglow zur Versilberung des Quarzsandes zur Desinfektion des Wassers empfohlene Verfahren (Reduktion von Silber mittels Formaldehyd) wurde durch Verwandlung des Metallsilbers an der Oberfläche in Silberoxyd wesentlich verbessert. Als Oxydationsmittel bewährte sich am besten Kaliumpermanganat (in heißer n/10-Lösung). Huminstoffe in größerer Menge hemmten die bakterizide Wirkung des Präparates; ein beträchtlicher Gehalt des Wassers an organischen Stoffen macht die Fällung der Schwebestoffe vor der Wasserdesinfektion erforderlich.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Abgeschlossen am 17. August 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 95. No. 5|8.
Ausgegeben am 28. Oktober 1936.

Nachdruck verboten.

Über die Bedeutung von Spurenelementen und Kolloiden bei der Deckenbildung von Azotobakter und über seinen Nachweis im Wasser.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt fur Milchwirtschaft in Kiel, Direktor Prof. Dr. W. Henneberg †.]

Von **C. R. Baier.**

Durch die grundlegenden Arbeiten Fischers (5, 6) wurde das Vorkommen stickstoffbindender Bakterien in Teichwasser und ihre u. U. große Bedeutung fur den Stickstoffhaushalt der Gewässer erwiesen. Allerdings glaubt Fischer, daß dabei Azotobakter eine weniger große Rolle spielt als die stickstoffsammelnden Bakterien der Pneumoniegruppe. Er konnte Azotobakter jedoch oft aus Teichwasser im Mannitmedium anreichern. Den von Beijerinck (2) aus Kanalwasser isolierten Azotobacter agilis fanden Kluyver und van Reenen (9) wiederholt in Graben- und Kanalwasser und sehen in ihm eine an das Leben im Wasser angepaßte und fur den Stickstoffhaushalt der Gewässer bedeutungsvolle Azotobakterart.

Überraschend war daher die Tatsache, daß es Verf. bei zahlreichen Versuchen niemals gelang, Azotobakter aus Wasser in elektiver Nährlösung anzureichern. Obgleich die zu diesen Versuchen benutzte Nährlösung nach Impfung mit Erde z. T. üppiges Azotobakterwachstum gab, lag die Vermutung nahe, daß nicht immer das Fehlen dieser Organismen in den Wasserproben, sondern auch die Zusammensetzung der Nährlösung Schuld an dem Versagen der Versuche tragen könnte. Diese Vermutung wurde durch die Veröffentlichung von van Niel (10) verstärkt, der nachwies, daß das scheinbare Fehlen von Azotobakter in gewissen Bodenproben durch das Versagen des verwendeten Nährmediums vorgetäuscht wurde. Das fur die Entwicklung von Azotobakter in Spuren notwendige Molybdän ist in manchen Böden in solcher Menge vorhanden, daß durch die Impfung mit der Bodenprobe genügend Molybdän in die Kultur gelangt. Bei Impfung mit molybdänärmeren Böden tritt Azotobaktervermehrung erst nach Zusatz von Na_2MoO_4 zum Nährmedium ein.

Es liegt nahe, fur Wasserproben, die doch meistens äußerst arm an Molybdänverbindungen sein dürften, ähnliches Verhalten anzunehmen. Wenn auch Wenzl (16) gutes Wachstum von Azotobakter in Elektivmedien ohne Molybdänzusatz erhielt, so führt van Niel (l. c.) mit Recht an, daß mit dem verwendeten Leitungswasser sehr wohl genügende Mengen der notwendigen Spurenelemente zugeführt werden können, die einem anderen Leitungswasser jedoch fehlen. Die Bedeutung der im Leitungswasser ge-

lösten Stoffe geht aus den Untersuchungen von Schröder (13) unzweifelhaft hervor. Bei Abwesenheit gewisser in Spuren notwendiger Elemente können diese u. U. durch Impfung mit Erde ersetzt werden, jedoch wohl nur in den seltensten Fällen durch Impfung mit Wasser oder Reinkultur. Da bei Herstellung von Medien zur Keimzahl- (Titer-) oder indirekten Aktivitätsbestimmung solche Zufälligkeiten jedoch ausgeschlossen sein müssen, ist es notwendig, die Zusammensetzung der Nährlösung durch Verwendung reinster Substanzen vollkommen übersehen und stets genau reproduzieren zu können. Aus diesem Grunde ist es nicht angängig, Leitungswasser zu verwenden oder Erde bzw. Rohhumussäure-Präparate zuzusetzen. Es sollte daher versucht werden, durch Verwendung von destilliertem Wasser und Zugabe der notwendigen Stoffe in chemisch reiner Form zum üblichen Elektivmedium dessen Zusammensetzung und Eignung vom Zufall unabhängig zu machen.

Da die bekannte fördernde Wirkung roher Humussäure nach den Untersuchungen von Remy und Rösing (12) auf das in dieser enthaltene Eisen zurückzuführen ist, und die Humussäure offenbar nur als Dispersionsmittel des Eisens und anderer Katalysatoren, vielleicht auch als Stoffwechselprodukte adsorbierendes Kolloid dient, sollte untersucht werden, ob es vielleicht förderlich sei, dem Nährmedium ein synthetisches Eisen-Humuspräparat oder ein anderes Kolloid zuzusetzen. Als ersteres könnte der von Waksman und Iyer (14) beschriebene „humus-nucleus", ein Lignoproteinat, als eisenhaltiger Komplex dienen. Für Azotobacter vinelandii haben Waksman und Iyer (15) bereits die fördernde Wirkung dieses Präparates beobachtet. Als weiteres Kolloid wurde Agar, dessen günstige Wirkung schon Schröder (13) erwähnt, benutzt. Es konnten so mit dem hydrobakteriologisch-methodischen Zweck der Arbeit Untersuchungen zur Physiologie von Azotobakter und zum Humusproblem verbunden werden.

Es wurden Versuche mit verschiedenen Nährmedien angesetzt. Als Grundmedium diente folgende Lösung: dest. Wasser 1000, Mannit 20, K_2HPO_4 0,5, $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,3, NaCl 0,5, $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,003, $CaCO_3$ 5,0. Auf den Zusatz einer Spur Eisen sollte nicht verzichtet werden, um den allgemeinen bakteriellen Stoffwechsel nicht zu stören. Die verwendete Menge stört zumal in dieser Form nach den Ergebnissen von Remy und Rösing (l. c.) die Versuche über die Bedeutung des Eisens nicht. Das Grundmedium wurde dreimal im Dampftopf sterilisiert und unmittelbar vor Beginn der Versuche mit den jeweiligen einmal sterilisierten Zusätzen versetzt. Geimpft wurde mit einer Rohkultur von Azotobacter chroococcum. Es wurden je zwei Parallelkulturen in mit 50 ccm Nährmedium (ca. 1½ cm Schichthöhe) beschickten 250 ccm Erlenmeyerkolben bei Zimmertemperatur angesetzt.

In der ersten Versuchsreihe wurden Kombinationen verschiedener Salze mit gereinigter Humussäure und Lignoproteinat verwendet. Die Ergebnisse der Versuche sind aus Tabelle 1 zu ersehen. Es ist zur Versuchsanordnung Folgendes zu bemerken: Gereinigte Humussäure wurde durch Extraktion von Erde mittels Natronlauge im Autoklaven, Fällung und Kochen mit einmal erneuerter Salzsäure, Filtrieren und Waschen erhalten. Lignoproteinat wurde durch Salzsäurefällung einer alkalischen Lösung von 5 Teilen Lignin und 1 Teil Kasein dargestellt. Es wurden 40 mg Humussäure, ungefähr 15 g Erde entsprechend, und die gleiche Menge Lignoproteinat für jede

Tab. 1. Deckenbildung von Azotobakter in verschieden kombinierten Nährmedien nach 4 Tagen in je zwei Parallelkulturen.

Zusätze zum Grundmedium	—	Gereinigte Humussäure	Lignoproteinat
—	0,0	0,1	0,0
Fe, Mo	2,2	4,4	2,3
Fe, Mo, Al, Cu, Zn, Si	3,3	5,4	4,4
Begleitstoffe der Humussäure	1,2	3,3	2,2
2 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,0	—	—

0 = keine Hautbildung, 1 = dünnes Häutchen, 2 = deutliche dünne Decke, 3 = stärkere Decke, 4 = starke Decke, 5 = sehr starke Decke.

Kultur verwendet. Die Kombination von Eisen mit den Humuspräparaten wurde durch Lösung derselben in Natronlauge, Neutralisation mit Salzsäure und Fällung mit Ferrichloridlösung hergestellt. Bei der Darstellung der Kombination mit den Humussäurebegleitstoffen wurde statt der Ferrichloridlösung der bei der Reinigung der Humussäure anfallende salzsaure Extrakt verwendet und zwar in einer Konzentration, die 15 g Erde entsprach. Wo die Humussäurebegleitstoffe nicht mit Humussäurepräparaten kombiniert waren, wurde dieser Extrakt, eingedampft und neutralisiert zugesetzt. Der Eisengehalt der fünf Präparate lag zwischen 2,0 und 3,5 mg. Soweit das Eisen nicht an Humuspräparate gebunden war, wurde es als Hydroxyd durch Rohrzucker in Lösung gehalten (vgl. R e m y und R ö s i n g , l. c.). Es wurden je 2,5 mg Fe zugegeben. Molybdän wurde als 0,05 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$, die übrigen Komponenten als 0,5 mg $Na_2SiO_3 \cdot 8\ H_2O$, 1,0 mg $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18\ H_2O$, 0,3 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ und 0,1 mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ zugesetzt. Von W o l f r a m wurde abgesehen, da es nach den Untersuchungen von B o r t e l s (4) neben dem Molybdän keine fördernde Wirkung hat. Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe ersieht man, daß das Grundmedium (auch in Gegenwart größerer Mengen von $FeSO_4$) kein geeignetes Milieu für Azotobakter ist, und daß es weder durch gereinigte Humussäure noch durch Lignoproteinat allein verbessert wird. Eisen und Molybdän regen zwar das Wachstum von Azotobakter an, doch haben andere Stoffe, wie Zink, Kupfer, Aluminium und Silicium und in Kombination mit Eisen und Molybdän auch gereinigte Humussäure noch eine weitere fördernde Wirkung. Letztere dürfte vorwiegend durch Verunreinigungen bedingt sein, da die Wirkung um so stärker ist, je weniger die übrigen Zusätze den Anforderungen des Organismus genügen. Eine fördernde Wirkung des Lignoproteinats ist besonders in Gegenwart mineralischer Katalysatoren deutlich. Seine Bedeutung dürfte nur auf kolloidalen Eigenschaften beruhen. Mit diesen Ergebnissen stimmen die von B i r c h - H i r s c h f e l d (3) überein, welche fand, daß die organische, nicht dialysierbare, in Alkohol und Äther unlösliche Komponente des Bodenextraktes wachstumfördernd auf Azotobakter wirkt.

Um die Vermutung der fördernden Wirkung von Kolloiden nachzuprüfen, wurde noch eine Versuchsreihe angesetzt, die als Kolloid Agar enthielt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Die genaue Versuchsanordnung entspricht der der ersten Versuchsreihe. Es wurde ein dreimal 24 Std. mit destilliertem Wasser gewässerter Agar benutzt. Zur Eliminierung der Wirkung

von Verunreinigungen des Agars wurde zum Grundmedium in einer Reihe neutralisierter, eingedampfter salzsaurer Auszug einmal gewässerten Agars zugesetzt. Als gereinigte Humussäure wurde solche benutzt, die durch dreimaliges Wiederauflösen, Fällen und Kochen mit Salzsäure weitgehender gereinigt war als im ersten Versuch.

Tab. 2. Deckenbildung von Azotobakter in Gegenwart verschiedener Kolloide nach 4 Tagen in je zwei Parallelkulturen

Zusätze zum Grundmedium	—	Agarextrakt	Agar 0,1%	Agar 0,05%	Agar 0,01%	Lignoproteinat	Humussäure
—	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fe, Mo	1,2	3,3	2,2	3,2	3,3	2,2	2,3
Fe, Mo, Al, Cu, Zn, Si	3,3	3,3	4,4	4,5	3,3	4,5	5,5

(Erläuterungen siehe Tab. 1).

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß Agar, Lignoproteinat und gereinigte Humussäure anregend auf die Deckenbildung von Azotobakter wirken, und zwar dürfte dies auf den Kolloideigenschaften dieser Stoffe beruhen. Daß leicht säurelösliche Verunreinigungen des Agars nicht mitwirken, ist daraus zu ersehen, daß diese zwar in Gegenwart von Eisen und Molybdän allein, nicht aber in Gegenwart der anderen hinzugezogenen Elemente fördernd wirken, während gerade in diesem letzteren Fall die Wirkung des Agars am deutlichsten ist. Das Optimum der Agarkonzentration ist mit 0,05% erreicht. Eine Ausnutzung des Agars als Energiequelle, wie sie Pringsheim (11) bei Symbiose mit B. gelaticus nachwies, kann hier nicht mitwirken.

Daß man von Kulturversuchen in vitro mit alkalischem Humusextrakt nicht ohne weiteres auf natürliche Verhältnisse schließen darf, geht aus Untersuchungen von Fischer (7) hervor. Während der von den meisten Autoren benutzte alkalische Humusextrakt je nach dem Reinheitsgrad der gewonnenen Humussäure auf Azotobakter mehr oder weniger stark fördernd wirkt, fand Fischer, daß mit destilliertem Wasser hergestellter, also schwach saurer Humusextrakt auch bei $CaCO_3$-Zusatz die Stickstoffbindung stark hemmt. Die Ursache hierfür geht aus den Versuchen Bortels (4) hervor, der fand, daß die fördernde Wirkung der Aschelösung des alkalischen Bodenextraktes durch die Aschelösung des saueren Bodenextraktes wieder illusorisch gemacht wird. Unter natürlichen Verhältnissen (Bodenflüssigkeit) hat man jedoch auch u. U. mit der physiologischen Wirksamkeit säurelöslicher Komponenten zu rechnen, wenn auch ihre Wirkung bei den im Boden auftretenden p_H-Werten nicht so groß sein dürfte, wie in Extrakten mit starken Mineralsäuren.

Nachdem durch vorstehend wiedergegebene Versuche erneut erwiesen ist, daß die Elemente Fe, Mo, Zn, Al, Cu und Si zur Anreicherung von Azotobakter notwendig sind, und eine einfache Zugabe von Eisensalzen nicht genügt, sondern das Eisen in Lösung gehalten werden muß, wurde noch das Eisen-Aluminium-Silikat nach Kaserer (8) erprobt. 1,0 g $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18\,H_2O$ und 0,25 g $FeCl_3$ werden gelöst, mit Na_2HPO_4-Lösung gefällt, der Niederschlag abfiltriert, in 500 ccm einer 0,3proz. Lösung von $K_2SiO_3 \cdot H_2O$ aufgeschwemmt und autoklaviert. Diese Lösung wird zu gleichen Teilen

mit einer 3mal im Dampftopf sterilisierten Lösung: dest. Wasser 500, Mannit 20, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,2, $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ 0,2, $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,005, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ 0,002, $CaSO_4 \cdot 2 H_2O$ 2,0 zusammengegeben.

Nach Beimpfung dieses Mediums wurde stets ausgezeichnete Deckenbildung erhalten, so daß nun zur praktischen Erprobung geschritten werden konnte. 9 Proben von Grabenwasser, 7 von Teich- und 5 von Seenwasser aus der Umgebung von Kiel und Mölln wurden in dieses Medium geimpft. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt. Sie zeigen, daß sich das oben angegebene Elektivmedium für den Nachweis von Azotobakter in Wasser eignet. Wurden jedoch die gleichen Proben in das Grundmedium, das zum Nachweis von Azotobakter in Erde geeignet war, geimpft, so wurde in keinem Falle eine deutliche Decke, sondern nur gelegentlich eine dünne Haut gebildet. Betreffs des Vorkommens von Azotobakter im Süßwasser sollen die Ergebnisse hier nicht ausgewertet, sondern einer späteren ausführlichen Bearbeitung vorbehalten werden.

Tab. 3. Azotobakternachweis in Wasserproben verschiedenen Ursprungs.

Proben		keine Decke	dünne Haut	Braunfärbung d. Decke	Farbstoffbildung	große Zellen
Ursprung	Zahl					
Grabenwasser . .	9	2	1	3	2	1
Teichwasser . .	7	3	2	1	1	0
Seenwasser . .	5	4	1	0	0	0

Die verschiedene Charakterisierung der Rohkultur soll auf die Artzugehörigkeit der betr. Stämme hinweisen, nicht jedoch eine Artbestimmung geben.

Ein methodischer Ausblick sei noch gestattet. Schon Beijerinck (2) erwähnt, daß es ihm gelang, *Azotobacter agilis* in Kanalwasser, das reich an organischen Stoffen war, nach Zusatz von Kaliumphosphat direkt anzureichern. Auf diese und ähnliche Art mag es u. U. möglich sein, direkte Aktivitätsbestimmungen [vgl. Baier (1)] zur Stickstoffbindung durch Azotobakter-Arten und bei Erweiterung der Methoden biologische Analysen des Nährstoffgehaltes des Wassers, wie sie in der Bodenbakteriologie bereits lange gebraucht werden, durchzuführen.

Zusammenfassung.

Im Interesse der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist es unbedingt erforderlich, Anreicherungen von Azotobakter in einem vollständig synthetischen Medium unter Vermeidung von Leitungswasser und Bodenhumus vorzunehmen. In Bestätigung der Ergebnisse früherer Untersucher wurde gezeigt, daß Azotobakter bei Gegenwart der Elemente Fe, Mo, Al, Zn, Cu und Si gut gedeiht. Ein Medium, das diese Stoffe enthält, wurde zusammengestellt und seine Brauchbarkeit zum Nachweis von Azotobakter im Wasser erwiesen.

Die fördernde Wirkung des Bodenhumus auf das Gedeihen von Azotobakter ist z. T. seinen mineralischen Verunreinigungen, z. T. den Kolloideigenschaften der reinen Humussäure zuzuschreiben. Auch Agar und Ligno-proteinat wirken auf diese Art anregend.

Literatur.

1. Baier, C. R., Arch. f. Hydrobiol. Bd. 29. 1935. — 2. Beijerinck, M. W., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. — 3. Birch-Hirschfeld, L., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 3. 1932. — 4. Bortels, H., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. — 5. Fischer, H., Arch. f. Hydrobiol. Bd. 10. 1915. — 6. Fischer, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II Bd. 46. 1916. — 7. Fischer, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 54. 1921. — 8. Kaserer, H., Ber d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 28. 1916. — 9. Kluyver, A. J. und Reenen, W. J van, Arch. f. Mikrobiol. Bd. 4. 1933. — 10. van Niel, C. B., Arch. f. Mikrobiol. Bd 6. 1935. — 11. Pringsheim, H. und E., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. — 12. Remy, Th. und Rosing, G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30 1911. — 13. Schröder, M., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 85. 1932. — 14. Waksman, S. A. und Iyer, K. R. N., Soil Sci. Bd. 34. 1932. — 15. Waksman, S. A. und Iyer, K. R. N., Soil Sci. Bd. 34. 1932. — 16. Wenzl, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934.

Nachdruck verboten

Schleimbildende Mikroben in der Zuckerfabrik.

Von **Mario Sacchetti**, Bologna.

Mit 4 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Die Techniker der Zuckerindustrie kennen die von Zeit zu Zeit oft mit überraschender Schnelligkeit auftretende Erscheinung schleimiger Massen in den Zuckersäften, in Deutschland als der sog. „Froschlaich“ bekannt, der in früheren Zeiten sehr häufig, aber auch heutzutage nicht gerade selten, schweren Schaden in den Zuckerfabriken anrichtet und sehr große Verluste verursachen kann.

Diese speziellen schleimigen Bildungen haben nicht nur wegen ihrer schädlichen Wirkungen in der Zuckerfabrikation, in den Raffinerien und in vielen industriellen Verarbeitungsweisen der Melasse lebhaftes Interesse erregt, sondern auch, da es sich um die Hervorbringung synthetischer Produkte durch spezielle Mikroben handelt, die Aufmerksamkeit der Chemiker und Bakteriologen auf sich gezogen, so daß heute über diesen Gegenstand eine umfangreiche Literatur existiert, von der wir uns darauf beschränken wollen, nur den Teil zu erwähnen, der direkt auf die vorliegende Arbeit Bezug nimmt.

Wir haben uns folgendes Ziel gesetzt: die aus in italienischen Zuckerfabriken aufgetretenem „Froschlaich“ isolierten Mikroorganismen zu identifizieren und zu untersuchen, welche eventuellen Beziehungen zwischen den Mikroben selbst und den Bedingungen bestehen, die das Auftreten der charakteristischen schleimigen Bildungen begünstigen könnten. Außer dem wissenschaftlichen Interesse kann eine solche Untersuchung heute wieder praktische Bedeutung gewinnen, die sie fast völlig verloren hatte, infolge der Einführung von Verarbeitungsweisen, mittels deren es möglich war, die Zuckersäfte immer auf einer derartig hohen Temperatur zu halten, die die Gefahr der Einwirkung schädlicher Mikroben ausschloß. Jedoch besteht diese Gefahr wieder in vollem Umfang, seitdem in einigen der modernen Saftreinigungssysteme. wie z. B. in denen von Teatini und von Dědek, eine Abkühlung des Rohsaftes bis auf 40° gefordert wird.

Die vorliegende Arbeit wurde teils im „Laboratorio Sperimentale del Consorzio Nazionale Produttori Zucchero" während der Campagnen 1934/35 und teils im „Laboratorio di Microbiologia Agraria" der Universität Bologna ausgeführt.

Ursprung, Beschaffenheit und Verhalten des untersuchten „Froschlaichs" in den wichtigsten Säften der Zuckerfabriken.

Zu Beginn der Campagne 1934 klagte eine Zuckerfabrik in der Po-Ebene über Betriebsschwierigkeiten infolge des Auftretens schleimiger Massen und es gelang uns, aus den Sammelbehältern des Dicksaftes eine gewisse Menge dieser Schleimklumpchen zu sammeln.

Es gelang uns jedoch nicht mit Sicherheit festzustellen, wo sich diese Schleimmassen tatsächlich gebildet hatten; wenn sie auch infolge des hohen spezifischen Gewichtes des Dicksaftes (etwa 31 Bé) in diesem an die Oberfläche gelangt und so zu sehen waren, so erschien es doch zweifelhaft, ob sie sich unter einem so hohen osmotischen Druck gebildet haben könnten.

Die erste Versuchsreihe sollte zur Feststellung der gemeinsamen Einwirkung aller in „Froschlaich" vorhandenen Mikroben auf die Saccharose einiger Zuckersäfte dienen. Eine gewisse Menge der schleimigen Masse wurde zu diesem Zweck zunächst gründlich in fließendem Wasser gewaschen, dann in entkeimtem Wasser, und dann auf Kolben verteilt, die Rohsaft, Dünnsaft und Dicksaft enthielten und bei einer Temperatur von ca. 40° gehalten wurden.

In dem Roh- sowie in dem Dünnsaft konnte eine deutliche Vermehrung der Schleimmassen festgestellt werden, die Analysen ergaben folgende Resultate:

Rohsaft	Polarisation	Reduzierter Zucker (Bertrand)	Säuregrad in ccm n/100 NaOH per 2 ccm	pH
Zur Zeit der Verimpfung . .	11,6	0,631	3,5	5,895
Nach 40 Stunden	9,6	1,848	5,3	5,627
Nach 4 Tagen	7,2	2,650	6,1	5,618

Dünnsaft	Polarisation	Dicksaft	Polarisation
Zur Zeit der Verimpfung	10,3	Zur Zeit der Verimpfung	64,2
Nach 24 Stunden . . .	9,8	Nach 24 Stunden . . .	64,4
Nach 48 Stunden . . .	8,9	Nach 48 Stunden . . .	64,3
Nach 4 Tagen	6,9	Nach 4 Tagen	64,4

Die angeführten Ziffern zeigen: daß der Verlust an Zucker verhältnismäßig gering ist, und zwar auch unter den Bedingungen des Versuchs doch anscheinend günstiger sind als diejenigen, die die Mikroben im normalen Arbeitsgang finden; daß die Azidität sich niedrig hält, daß schließlich im Dicksaft weder eine Vermehrung der Schleimklümpchen, noch ein Verlust an Saccharose zu verzeichnen ist.

Das makroskopische Bild des Schleims entsprach durchaus jenem typischen, schon mehrfach und von vielen Autoren beschriebenen. Das nach dem Verfahren Lippmann (1) untersuchte chemische Verhalten des gereinigten Schleims entsprach völlig dem der Dextrans.

Die mikroskopische Untersuchung ergab die Anwesenheit von im Innern von riesigen Schleimhüllen enthaltenen Kokken, die gewöhnlich gepaart, aber nicht selten auch zu drei oder mehr Gliedern zusammengeschlossen zu finden waren; außerdem fanden sich einige stäbchenförmige Zellen und vereinzelte Blastomyzeten.

Isolierung der Mikroben aus dem „Froschlaich".

Die Isolierung der Mikroben wurde zunächst auf folgende Weise versucht: die Schleimklümpchen wurden lange in sterilisiertem Wasser gewaschen und dann zerkleinert und die so erhaltenen Suspensionen wurden entweder ohne weiteres auf Petrischalen übergeimpft oder vorher eine $1/_{1}$ Std. lang auf einer Temperatur von 75° gehalten, wie Liesemberg und Zopf (2) empfehlen. Als Substrate kamen zur Anwendung: Agar und Gelatinen mit Rohsaft, mit Hefewasser und mit Bouillon mit 2% Saccharose. Nach 8tägiger Bebrutungsdauer bei einer Temperatur von 30° wurden Kulturen von Kokken, Bakterien und Hefen sowohl aus den vorher erwärmten wie aus den unbehandelten Suspensionen erhalten. Während jedoch die Kulturen der Bakterien und Hefen sich von Anfang an rein erwiesen oder doch ohne Schwierigkeiten nach einigen Durchgängen in Petrischalen rein zu erhalten waren, fingen die Strichkulturen der Kokken, die anfangs ebenfalls rein erschienen, sehr rasch zu degenerieren an, so daß nach Ablauf einer Woche das makroskopische Bild ein völlig anderes war und die mikroskopische Untersuchung eine immer stärkere Vermehrung beweglicher, stäbchenförmiger Zellen ergab.

Das von Liesemberg und Zopf empfohlene und von vielen anderen Autoren ausgeführte Erwärmen des „Froschlaichs" hat sich zwar als wirksam erwiesen, um ihn von den gewöhnlichen Mikroben, die ihm äußerlich anhaften, zu befreien, es ist jedoch nicht geeignet zu einer sicheren Trennung der im Inneren der Schleimklümpchen befindlichen Mikroorganismen.

Infolgedessen haben wir dann, um die notwendige Reinheit der Kulturen der 3 Arten von Mikroben zu erreichen, die Isolierung auf nachstehende Weise vorgenommen: zur direkten Gewinnung der bazillären Formen aus den Schleimmassen hat sich die von Maassen (3) für die Kultur seines Semiclostridium commune empfohlene Lösung als sehr brauchbar erwiesen, deren Alkalinität die Entwicklung der Bakterien fördert, während sie die Vermehrung der Kokken hemmt und die der Saccharomyzeten wesentlich vermindert. In einem Versuch mit einem Stamm von Leuconostoc mesenterioides, den wir aus den handelsüblichen trockenen Feigen isoliert hatten, und der in hohem Maße schleimbildend ist, konnten wir in der Tat feststellen, daß in der Maassenschen Lösung nicht nur jedwede Entwicklung völlig ausblieb, sondern daß auch die mikrobenhaltige Masse, die während eines gewissen Zeitraums in dieser Lösung aufbewahrt wurde, die Fähigkeit, sich zu vermehren, verliert, selbst wenn sie wieder in ein geeignetes Substrat verbracht wird. Die Reinigung der Hefekulturen als Einzelkulturen machte keinerlei Schwierigkeiten. Um die Kokkenformen mit Sicherheit rein zu erhalten, wurden in einige Reagenzgläser mit glukosehaltigem Hefewasser ganz junge Kulturen übergeimpft, die aus den auf 75° erwärmten Suspensionen gewonnen waren, um so nicht verkapselte und daher leichter trennbare Zellen zu erhalten. Aus den Gläsern, in denen eine deutliche Trübung, aber keine Hautbildung zu erkennen war — letztere ist ein sicheres Zeichen für die Verunreinigung mit bazillären Formen —, und deren

mikroskopische Untersuchung das alleinige Vorhandensein von Streptokokken ergab, wurde in Petrischalen mit Agar aus gezuckertem Hefewasser übergeimpft, und die Schalen wurden dann anaerob in Majmons Apparat aufbewahrt. Auf diese Weise zeigte sich nur bei den wenig sauerstoffbedürftigen Mikroben — wie es zwar die schleimbildenden Kokken, aber weder die bazillären Formen, noch die Hefen sind — nach 3tägiger Aufbewahrung im Thermostat bei einer Temperatur von 30° eine deutliche Bildung von Kolonien. Nach drei- bis viermaliger Wiederholung der Plattengüsse unter anaeroben Verhaltnissen wurden absolut reine Kulturen erzielt, die sich bei niedrigen Temperaturen in Stichkulturen in Agar, wie sie Orla-Jensen (4) für die Lebenderhaltung von Milchsäurebakterien empfiehlt, als unbeschränkt haltbar erwiesen. Nach in der vorbeschriebenen Weise mehrfach wiederholten Isolierungen aus in der Zuckerfabrik gesammelten Schleimklümpchen gelang es uns, Reinkulturen der 3 Arten von Mikroorganismen zu erhalten — Kokken, Bazillen und Hefen —, zu deren Beschreibung wir nunmehr übergehen werden, indem wir sie mit den schon früher bekannten vergleichen werden.

Kokkenartige Bakterien.

Das Erscheinen der Arbeiten von Jubert (5) stellt die erste Behauptung des mikrobischen Ursprungs der Schleime in Zuckerfabriken dar, welche von anderen Autoren als aus dem Zellplasma der Zuckerrüben stammend angesehen wurden; Menges-Teixeira (6) hat als erster im Inneren der Schleimklümpchen kleinste kuglige Körperchen wahrgenommen, die die Fähigkeit besitzen, sich zu vermehren; Cienkowski (7) bestätigt, daß man diese Schleimklümpchen als Zoogleen eines kugelförmigen Bakteriums anzusehen hat, dem er, wegen des mesenterienartigen Aussehens der Zooglee selbst, den Namen Ascococcus mesenteroides gibt, welchen Namen van Tieghem (8) später in Leuconostoc mesenteroides umändert. Diese Mikrobe ist zum erstenmal von Liesenberg und Zopf rein erhalten worden, die den Namen der Art in L. mesenterioides umändern. Später werden von Schoene (9) zwei „Coccus", I und II, von Zettnow (10) der Leuc. Aller und der Leuc. Opalanitza und von Gonnermann (11) der Mixococcus Betae [1]) beschrieben.

Diese Mikroorganismen, die die Autoren, welche sie untersuchten, schon selbst als dem L. mesenterioides sehr nahestehend erkannt hatten, scheinen uns heute, nach den umfangreichen und sorgfältigen Untersuchungen von Orla-Jensen (4), Hucker und Pederson (12), ohne weiteres mit dieser Art identisch zu sein. In der Tat sind die von den verschiedenen Autoren für die Aufstellung dieser von ihnen beschriebenen Arten als grundlegend bezeichneten Eigenschaften — als da sind: Ausbleiben von Schleimbildungen aus Traubenzucker; Verhalten in Milch; Einfluß des Kalziumchlorids auf die Entwicklung; Eigenschaften der Kulturen auf Kartoffeln oder in anderen Substraten; Ausbleiben der Entwicklung, wenn Asparagin die alleinige Stickstoffquelle ist — entweder als wesentliche Attribute des L. mesenterioides erkannt worden oder aber sie kommen doch in den weitgehenden Schwankungen der Eigenschaften, die für diese Art charakteristisch sind, vor.

Die systematische Stellung dieses Mikroben wird durch die Umänderungen in der Nomenklatur, durch die seine Klassifikation mehrfach verschoben wurde, außerordentlich verwirrt und verwickelt.

[1]) Eine umfangreiche Zusammenfassung der hauptsächlichsten Arbeiten über schleimbildende Kokken und Bazillen bringt Wenzel (13) in einer Arbeit, in der er über einige von ihm als Leuc. mesenterioides und Clostr. gelatinosum identifizierte Bakterien berichtet.

In der von Saccardo (14) referierten Klassifikation von de Toni und Trevisan wird die Gattung Leuconostoc mit dem Vorhandensein der „capsulae amplae, crassisimae, lamellosae" begründet, die jedoch, wie sich spater herausstellte, eng an das Vorhandensein von Saccharose in der Kulturflüssigkeit gebunden sind, in dessen Abwesenheit der Mikrobe seine Kolonien in der gewöhnlichen Weise wie alle Streptokokken bildet, so daß in allen spateren Klassifikationen Streptococcus mesenterioides genannt wird. Gemäß der Neigung vieler Autoren, mit einem von ihnen gebildeten Genusnamen zugleich die hervorstechendsten physiologischen Eigenschaften und den bevorzugten Aufenthaltsort sinnbildlich veranschaulichen zu wollen, hat Beijerinck (15) einen von ihm aus einem Kanal in Delft isolierten schleimbildenden Mikroben Lactococcus dextranicus genannt, während Orla-Jensen (4) der Gattung Leuconostoc den Namen Betacoccus zuspricht.

Die ständige Anwesenheit schleimbildender Kokken in den Zuckerfabriken, den Raffinerien und überall dort, wo Zuckersäfte oder Zuckerrüben oder Zuckerrohrmelasse verarbeitet werden, geht aus den unzähligen diesbezüglichen Erwähnungen der Wissenschaftler in aller Welt hervor. Aber noch ungleich viel größer ist die Verbreitung dieser Mikroorganismen in der Natur, wo sie, vortrefflich ausgerüstet zur Zerstörung der auf hydrolytischem Wege gewonnenen Produkte pektischer Substanzen, eine wichtige Aufgabe im natürlichen Kreislauf der organischen Materie erfüllen.

Orla-Jensen (4) sagt, daß die von ihm Betacoccus genannten Milchsäurebazillen auf den Zuckerruben verbreitet sind wie die Saccharomyceten auf zuckerhaltigen Früchten und daß sie, in den Verdauungstraktus von Tieren eingeführt, in die Milch überwandern[1]); auf diese Weise erklärt sich ihre Verbreitung in dieser Substanz und in ihren zahlreichen Derivaten, als da sind: Sahne, Butter, Käsesorten, Kefir usw. Barendrecht (16) isolierte aus Kulturflüssigkeiten zur Gewinnung von Lufthefen den L. Agglutinans, der als dem L. mesenterioides sehr nahestehend, falls nicht völlig mit ihm identisch angesehen wird. Nadson und Batschinskaia (17) fanden im Gummifluß von Eichen den L. Lagerheimii, den die Autoren selbst mit dem L. mesenterioides identifizieren. Knudsen und Soncke (18) fanden im Sauerteig den Betacoccus arabinosaceus und B. bovis. Pederson (19) stellte in verschiedenen aus Tomaten hergestellten, verdorbenen Fabrikaten in großer Menge den L. pleofructi fest, der von Hucker und Pederson (12) ebenfalls mit L. mesenterioides identifiziert wurde, von dem Pederson (20) außerdem feststellte, daß er immer im Sauerkraut vorhanden und hier möglicherweise zur Erzeugung des Aromas nötig sei. Aus den im Handel erhältlichen trockenen Feigen hatten wir u. a. einen Schleimbildner vom Typus des L. mesenterioides isoliert. Die neuesten Untersuchungen tragen ferner dazu bei, das schon sehr umfangreiche Verbreitungsgebiet der Mikroben dieses Typus noch zu erweitern. Smit und Louwe Kooymans (21) haben weitgehende Übereinstimmungen zwischen Str. faecalis und Lactococcus dextranicus, dem Schleimbildner von Beijerinck, festgestellt, den Smit (22) für identisch mit L. mesenterioides ansah, der aber nach Ansicht von Hucker und Pederson einer besonderen Art angehören soll. Oerskow und Poulson (23) stellten die außerordentlich große Verbreitung gewisser schleimbildender Streptokokken im Speichel gesunder und kranker Männer fest, die Koch (24) später untersuchte und als dem L. mesenterioides gleich feststellte. Mit diesem letzteren identifizierte er ferner den L. hominis des Hlava (25).

Aus vorstehendem geht hervor, daß L. mes.[2]) mehrfach unter ver-

---

[1]) Smit (22) sieht den Streptococcus hornensis, den Boekhout (26) aus Milch dargestellt und beschrieben hat, als identisch mit Leuc. mes. an.

[2]) Ohne uns um Fragen der Systematik zu kümmern, die heute mehr als je infolge der Anhäufung von Vorschlägen für eine bakteriologische Klassifikation brennend geworden sind, haben wir es für angezeigt gehalten, für diesen Mikroben den Namen Leuconostoc mesenterioides beizubehalten, den wir hinfort wie oben abkürzen werden, anstatt die Namen Streptococcus, Lactococcus und Betacoccus anzuwenden, einmal deshalb, weil der Mikrobe unter obigem Namen nunmehr der Allgemeinheit der Techniker und der Wissenschaftler in der Zuckerfabrikation geläufig ist, und ferner, weil diese Gattung, worauf Hucker und Peder-

schiedenen Gattungs- und Artnamen beschrieben worden ist, wobei es sich jedoch höchstens um Abarten des gleichen Mikroorganismus handeln dürfte; es ergibt sich ferner, daß derselbe außerordentlich verbreitet ist, und wahrscheinlich ständig in den Zuckerfabriken vorkommen wird, wo seine Anwesenheit jedoch erst dann offenkundig und gefahrdrohend sein dürfte, wenn die physikalische und chemische Beschaffenheit der Säfte es ihm ermöglicht, sich zu vermehren und auf die Saccharose einzuwirken.

Wir werden jetzt zur Beschreibung der Technik, die zur Untersuchung dieser Mikroorganismen angewendet wurde, übergehen.

Bei der vorläufigen Unterscheidung zwischen den Kolonien der Milchsäurekokken und denen der Bazillen hat uns die Prüfung auf Katalase gute Dienste geleistet, ein Enzym, das, wie Orla-Jensen (27) und Beijerinck (28) zeigten, sich in der Mehrzahl der Mikroorganismen findet, aber den milchsäure- und vielleicht auch den buttersäurebildenden Mikroorganismen fehlt.

Die morphologische Untersuchung der Zellen ist sowohl in Kulturen auf festem Substrat, wie auch in den gewöhnlichen Kulturaufgüssen und auch in den Säften der Zuckerfabrikation durchgeführt worden.

Eine Färbung der Umhüllungen, die sich leicht durch Kontrastfärbung mit Gram und Rosolsäure hätte erzielen lassen, ist uns niemals erforderlich erschienen.



Abb. 1. Froschlaich aus Leuc. mes. Vergr. 1,5×.



Abb. 2. Leuc. mes. in Froschlaich. Vergr. etwa 500fach.

In der Tab. 2 sind die Eigenschaften zweier schleimbildender Kokken, von denen der eine (1137) aus Schleimen einer Zuckerfabrik herstammt, der andere (1200) aus trockenen Feigen isoliert wurde, den Eigenschaften von Kokken, die Orla-Jensen, Hucker und Pederson mit derselben Technik aus Säften der Zuckerfabrikation gewonnen haben, gegenübergestellt worden.

son hinweisen, mit seinen in der Hauptsache ellipsenförmigen Zellen als Verbindungsglied zwischen den typischen Mikrokokken und den bazillären Formen angesehen werden kann.

Tabelle 2.

Leuc. mesenterioides Untersuchte Stämme	Verbrauch von ccm n/10 NaOH auf 10 ccm einer 2 proz. Losung der nachfolgenden Substanzen nach Ablauf von 15 Tagen bei 25° C																	
	Arabinose	Xylose	Ramnose	Glykose	Laevulose	Mannose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Inulin	Dextrin	Stärke	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salyzin
Leuc. mes. 1200	7,2	7,0	0,0	2,5	4,0	1,4	0,8	6,9	2,3	0,5	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	0,5
„ „ 1137	3,1	2,8	0,0	3,4	3,7	3,5	0.0	4,2	2,1	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,7	1,5
14 Huck. Ped. = 12 O.-J.	5,5	2,8	0,5	0,7	4,5	4,0	3,7	4,5	4,5	—	0.7	0,0	0,0	—	0,0	0,0	0,0	0,0
47 „ „ = 11 O.-J.	4.2	0,7	0,7	4,5	4,0	4,1	2,5	3.7	3,5	3,0	0.0	0,0	0,0	—	0,0	1,7	1,5	3,7
58 „ „	9,0	7,7	2,5	6,2	10,0	8,0	4,7	12,4	4.5	1,7	2.0	0,0	0,0	2,0	0,0	2,7	3,0	4,0
59 „ „	10,0	7,0	0,0	5,0	7,0	5,0	3,5	9.2	4,5	2,2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,2	2,5
60 „ „	10,0	6,2	1,5	5,5	5,7	4,5	2,5	8,7	3,7	2,0	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	2,7
63 „ „	1,2	1,2	0,7	1,5	2,0	1,2	0,0	2.0	2,0	0.0	0,0	12,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,2
65 „ „	8.7	7,5	1,5	7,0	10,0	7,0	5,0	10,4	5,0	2,2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	4,5	3,5
67 „ „	12,4	1,2	1,0	2,5	7,5	15,0	4,0	1,0	2,5	0,0	2,5	0,0	0,0	0,9	0.0	3,0	0,5	4,0
70 „ „	5,5	4,5	1,0	2,5	5,5	1,5	1,5	6.0	2,5	0,0	0.0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7
73 „ „	6,2	4,5	1,0	3,5	5,5	1,7	0,0	5,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	—	—
83 „ „	6,2	2,5	1,5	8,5	12.0	7,0	3,0	7,5	2,0	0.0	2,5	0,0	0,0	0,6	0,0	2,5	1,2	3,0
11 Orla-Jensen[1])	3,4	4,5	0,0	5.9	2,7	1,8	0,5	5,0	2,9	1,8	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	9,0	0,0	4,1
12 „ „	1,8	9,0	0,0	7,2	—	—	—	6,3	—	—	5,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,9	0,0	5,0

[1]) Orla-Jensen verwendet n/4 NaOH statt n/10 und die angefuhrten ccm beziehen sich auf diese Lösung.

Wie aus den Angaben in der Tabelle hervorgeht, ist ein solcher Vergleich durchaus möglich. Jedoch ist das Verhalten in Lackmus-Milch von dem, was die Autoren mit ihren Stämmen feststellen konnten, etwas verschieden. In der Tat folgt auf eine völlige Entfärbung, die innerhalb der ersten 24 Std. auftritt, nach 3tägiger Aufbewahrung im Thermostaten bei 30° die Bildung eines weißen Koagulats, während die Abscheidung von Molken unterbleibt; das Koagulat färbt sich, von oben nach unten fortschreitend, allmählich rot und nach etwa 20 Tagen ist die Rötung vollständig, immer ohne Abscheidung von Molken, und es kann sich so, in mit Gummistopfen verschlossenen Gläsern, viele Monate lang halten.

Das Aussehen der Kolonien, die auf den verschiedenen zuckerhaltigen Agar- oder Gelatinesubstraten, in Kartoffel-, Zuckerrüben- oder Mohrrübenscheiben gewonnen werden, stimmt genau mit dem so oft für L. mes. beschriebenen überein; wir möchten nur beiläufig darauf hinweisen, was übrigens auch schon von anderen festgestellt worden ist, daß die Kulturen in Gelatine und Agar nur in den ersten Durchgängen das charakteristische, schleimige, glänzende, gekrösеartige Aussehen haben, daß sich dieses Aussehen jedoch mehr und mehr verliert und die Beläge immer trockner werden; diesem Wechsel im Aussehen bei Kulturen auf festen Substraten entspricht eine Abnahme des Schleimbildungsvermögens in flüssigen Substraten.

Nachdem schon so zahlreiche und umfangreiche Arbeiten über den Biochemismus dieser Mikroben vorliegen, schien es uns nicht erforderlich, umfangreiche Untersuchungen in dieser Hinsicht anzustellen. Immerhin konnten wir, der von Pederson und Breed (29) vorgeschlagenen Technik folgend, bestätigen, daß die schleimbildenden Milchsäurekokken, im Gegensatz zu den Streptokokken, die 90—95% des Zuckers in rechts-

drehende Milchsäure umwandeln, nie mehr als 50% des Zuckers in nichtflüchtige Säuren verwandeln, die immer von einem erheblichen Prozentsatz flüchtiger Stoffe begleitet sind, insbesondere Essigsäure, Äthylalkohol und Kohlensäure; sie bilden ferner aus Saccharose und Lävulose auch Mannit.

Da fast alle Autoren der speziellen Beschaffenheit der erzeugten Milchsäuren einen besonders großen diagnostischen Wert zuschreiben, haben wir den Prozentsatz an Kristallwasser im Zinklaktat, das mit der von Hammer (30) vorgeschlagenen Methode gewonnen wurde, festgestellt, und ferner die Richtung der optischen Drehung der wäßrigen Lösungen der Säuren; wir kamen so zu dem Ergebnis, daß die in den Kulturen unserer beiden Kokken erzeugte Milchsäure linksdrehend sei.

Auf dem in reichlicher Menge aus den ersten Kulturen, die mit verdünntem und weitmöglichst gereinigtem Dicksaft hergestellt wurden, gesammelten Schleim sind nach dem Verfahren von Lippmann (1) die Löslichkeit, Fällbarkeit, das Verhalten gegen Fehling vor und nach der Hydrolyse und die Richtung der optischen Drehung der Lösungen vor und nach der Hydrolyse bestimmt worden; alle diese Bestimmungen haben bestätigt, daß die beiden von uns untersuchten Schleime der Kokken Dextrane sind. Die Eigenschaften der beiden Kokken entsprechen also den von Orla-Jensen und Hucker-Pederson dem Leuc. mes. zugeschriebenen und lassen sich wie folgt zusammenfassen: Wachstum in Diplokokken oder Kettenform, Mikroorganismen, frei von Katalasen, nicht imstande, Nitrate zu reduzieren und sich an der Oberfläche zu entwickeln, nicht immer oder zum mindesten nur sehr langsam die Gelatine verflüssigend. Außer der linksdrehenden Milchsäure erzeugen sie flüchtige Säuren, Äthylalkohol, Spuren von CO_2; aus Saccharose und Lävulose erzeugen sie auch Mannit. Die Fähigkeit, aus Saccharose Dextran zu bilden, ist eine außerordentlich variable Eigenschaft von großer Labilität. In Milch ist ihr Verhalten veränderlich. Sie vergären weder Inulin noch Stärke, ausnahmsweise Dextrin, ziemlich häufig Raffinose, wenn jedoch die Vergärung der letzteren ausbleibt, so unterbleibt gewöhnlich auch die Vergärung des Salyzins; gegen Arabinose und auch gegen Xylose haben sie sich aktiv gezeigt.

Schleimbildende Bazillen.

Nach der Entdeckung des L. mes. sind während einer Reihe von Jahren alle in den Säften der Zuckerfabriken auftretenden Schleimbildungen unterschiedslos ohne weiteres der Einwirkung dieses Mikroben zugeschrieben worden. Erst 15 Jahre nach dem Erscheinen der Arbeiten von Cienkowski ist die Fähigkeit, auf Kosten der Saccharose Schleim zu bilden, auch einigen bazillären Formen zuerkannt worden.

Koch und Hosaeus (31) isolierten Bact. pediculatum aus „Froschlaich“, der aus einem Syrup zweiter Qualitat stammte; da die Autoren ihren Mikroorganismus nicht rein erhalten konnten und nur über einige Eigenschaften desselben berichten, so läßt sich leider nicht feststellen, welche verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen ihm und anderen später beschriebenen Schleimbildnern bestehen. Glaser (32) fand Bact. gelatinosum Betae; Poupê (33) weist auf einen sporenbildenden Bazillus hin, der später als identisch mit Clostr. gelatinosum angesehen wurde, den Laxa (34) untersucht hatte. Kramer (35) beschreibt den Bac. viscosus sacchari; Maassen (3) stellte eine neue Gattung auf, von der er vier Arten beschreibt: Semiclostridium commune, S. flavum, S. citreum und S. rubrum; Gonnermann (36) beschrieb außerdem Mixococcus, einen Mixobacillus Betae; Greig Smith (37) beschrieb mehrere Rassen des Bac. levaniformis.

Tabelle 4.

Name der Bakterienart	Bac. vulgatus (Flügge) Mig.	Bact. gelatinosum betae Glaser	Clostr. gelatinosum Laxa
Große und Form der Stäbchen	1,6—5 × 0,8 μ Enden nur schwach abgerundet, einzeln oder in Ketten oder Fäden	Kurz, oft zu Ketten vereinigt	0,8—1,7 × 2,5—3,3 μ oft zu Ketten vereinigt
Beweglichkeit	Beweglich und peritrich	Sehr beweglich	Nur junge Zellen sind beweglich
Färbbarkeit nach Gram	Farbbar	—	Färbbar
Sporenbildung und Sporenkeimung	Elliptische Sporen 0,6 × 1,2 μ	Nicht beobachtet, aber Resistenz der Kulturen bei 100° C festgestellt	Elliptische Sporen 0,5—0,8 × 0,8—1,6 μ; Mutterzelle häufig in der Mitte zitronenförmig vergrößert
Verhalten in Gelatine	Verflüssigung u. Häutchenbildung an der Oberfläche	Schnelle Verflüssigung	Verflüssigung an der Berührungsstelle mit den Kolonien
Bouillonkulturen	Schwache Trübung, festes Häutchen grau-weiß	—	Nach Hinzufügung von höchstens 40% Saccharose oberflächliches Häutchen und flockiger Nierderschlag
Kartoffelscheibenkulturen	Sehr variable, gewöhnlich gekröseartige Filme, weißgrau, gelblich oder rosabraun, manchmal schleimig	—	Schleimbildung; der gekröseartige Film, braun oder rosa, ist erst zäh, später schmierig. Die Kartoffel färbt sich braun oder rot
Milchkulturen	Schleimig geronnen, später Lösung der Koagula	—	Gerinnung am 5. Tage, Bildung flüchtiger Säuren, Käsegeruch
Sauerstoffbedürfnis	Aerob	—	Aerob
Temperaturen	—	Opt. 40°—50°	Min. 20°, Opt. 40°, Max. 58°
Reduktion von Nitraten	Positiv	—	Positiv
Indol-Produktion	Negativ	—	—
Verhalten gegen Saccharose und andere Zucker	Lävulasebildung aus Saccharose. Inversion der Saccharose unter Säurebildung. Aus Glykose wenig Säure-, keine Gasbildung, aus Laktose keine oder fast keine	Bildung von Dextran - ähnlichen Schleimen; starke Inversion der Saccharose, keine Säurebildung, Erzeugung von Alkohol	Schleim, der durch Hydrolyse Fruktose erzeugt; Inversion der Saccharose, unter Bildung von CO_2; in mineralischen Lösungen auch von Alkohol, Milchsäure und flüchtigen Säuren. Assimiliert Glykose, Fruktose, Laktose, Galaktose, Raffinose, Dextrin, Stärke, und auch Arabinose und Mannose, in deren Lösungen es saure Reaktion hervorruft

Tabelle 4.

Semiclostr. commune Maassen	Bac. laevaniformis G. Smith	Bac. 1076
1,75 × 2—5 μ in langen Fäden	0,4—1,3 × 2—6 μ	0,8—1 × 1,5—5 μ Enden nur schwach abgerundet, in Ketten oder Fäden
Beweglich und peritrich	Beweglich	Beweglich und peritrich
—	—	Farbbar
Bei schwacher Luftzufuhr liegen die Sporen von 0,8 × 1,75 μ quer im engsten Teil der Mutterzelle, die an einem Pol birnen- oder rubenförmig vergrößert ist. In Aereobiose ohne vorstehende Umbildung. In Anaereobiose keine Sporenbildung. Die Sporen keimen quer zur Hauptachse	Sporenbildung	Elliptische Sporen 0,8 × 1,7 μ, Mutterzelle in der Mitte vergrößert. Sporenkeimung äquatorial
Verflussigung aber geringe Entwicklung infolge von niedrigen Temperaturen	Verflüssigung	Schnelle, sackförmige Verflüssigung in Stichkulturen und Bildung eines oberflächlichen Häutchens
—	Trübung, runzliges und dichtes Häutchen	Schwache Trubung, oberflächliches Häutchen stark gerunzelt, fest mit Tropfenbildung an der Oberfläche, flockiger Niederschlag
Entwicklung ähnlich dem roten Kartoffelbakt., schleimig, Tropfen	Weiß-rosa, trocken, fein gerunzelt (Typ α) oder gelb fettig, gewellt und gerunzelt (Typ β und ββ)	Gekröseartiger Film, weiß-grau, zäh, matt, Kartoffel gebräunt
Gerinnung, später Lösung der Koagula	Gerinnung und Lösung mit leicht saurer oder alkalischer Reaktion	Langsame Gerinnung mit vorhergehender Alkalinisation und folgender Lösung der Koagula
—	Aerob	Aerob
Min. 18°, Opt. 45°, Max. 55°	Opt. 37°	Min. 17°, Opt. 40°, Max. 55°.
Positiv	—	Positiv
—	—	Negativ
Inversion der Saccharose. Lävulanbildung. Aus Saccharose und Hexosen Bildung von CO_2; Alkohol, Ameisen-, Essig- und rechtsdrehendere Milchsäure. Keine Bildung von Buttersäure	Lävulanbildung	Lävulanbildung aus Saccharose. Für Säurebildung aus Zuckern, Polysacchariden, Alkoholen und Glykosiden (vgl. Tab. III)

Außer den genannten, in den Saften der Zuckerfabriken gefundenen Bazıllen sind zu erwahnen: der „Gommobacter“ von Fernbach und Schoen (38), der Bac. emulsionis, von dem Beijerinck (39) behauptet, daß er gewohnlich im Zucker vorkommt und der anaerobe Granulobacter (Clostr.) polymyxa (Prazmowski) Beij. (40).

Aber die Fähigkeit, die aus der Inversion von Saccharose stammende Lävulose in Anhydride zu verwandeln, kommt anderen Bakterien, die in der Natur außerordentlich verbreitet sind, auch zu.

Vogel (41) wies in der Tat nach, daß Bac. subtilis und Bac. mesentericus unter bestimmten Bedingungen die Fahigkeit haben, sich mit einer Hulle zu umgeben, und Seiler (42) zahlt den Bac. mesentericus und den Bac. vulgatus unter den Mikroben auf, die Schleime bilden, bei deren Hydrolyse Fruktose erzeugt wird.

Die Anwesenheit der letztgenannten Mikroben bei der Verarbeitung von Zuckerrüben- und Zuckerrohrsaften ist wiederholt festgestellt worden; unter den Bakterien, die in der Hauptsache die Flora des Zuckers ausmachen, findet van der Bijl (43) vornehmlich Formen, die dem Bac. vulgatus und dem Bac. gummosis zugeschrieben werden konnen, und denen er, außer dem Inversionsvermogen, auch die Fahigkeit der Schleimbildung zuspricht.

Alle die aufgeführten Bakterien können also synthetische Produkte bilden, sofern sie die für diese spezielle Umformung der Saccharose geeignete Bedingung vorfinden. Aber im Gegensatz zum von L. mes. erzeugten Dextran, aus dem in der Regel die umfangreichen Umhüllungen der mikrobischen Zellen gebildet werden, bleiben die Schleime von bazillärer Herkunft entweder gelöst in der Nährflüssigkeit oder aber sie verdichten sich zu „Froschlaich“-ähnlichen Klümpchen, in denen jedoch die aus langen, fadenförmigen Gebilden bestehende bakterielle Masse nicht so eng eingeschlossen ist, wie das bei L. mes. der Fall ist.

Das chemische Verhalten dieses von Bakterien erzeugten Schleimes ist ähnlich dem des Dextrans, von dem jedoch es insofern abweicht, als aus der Hydrolyse Lävulose hervorgeht; deshalb sind derartige Anhydride Lävulane oder, nach Smith, Levane genannt worden.

Bezüglich genauerer Angaben verweisen wir auf die Originalarbeiten oder auf die diesbezüglichen Handbücher und haben uns darauf beschränkt, in der Tab. 4[1]) die wichtigsten Eigenschaften hinsichtlich Züchtung, Morphologie und Physiologie der hauptsächlichsten Schleimbildner bei der Zuckerfabrikation und des Bac. vulgatus darzustellen, ferner des Bazillus 1076, den wir aus „Froschlaich“ isolierten, in dem er zusammen mit L. mes. und mit Saccharomyces vorkam, der später beschrieben werden wird. Außer den Eigenschaften dieses Mikroben, die die Tabelle anführt, sind noch andere bestimmt worden, über die weiter unten berichtet werden wird.

Zunächst sei über einige Untersuchungen berichtet, mittels derer festgestellt werden sollte, ob der aus Bazillus 1076 erzeugte Schleim dem Lävulan entsprach.

In Kolben mit der Maassenschen Lösung (50 g Pepton + 14 g Soda + 2 g sekundäres Natriumphosphat + 200 g Rohrzucker in 1 l Wasser) eingeimpft, bildeten sich nach Verlauf von einigen Tagen im Thermostat bei 35° Schleimkügelchen, die den von Maassen beschriebenen (vgl. Abb. 3 und 4) sehr ähnlich waren, diese hielten sich anfänglich am Grund

---

[1]) Als Quellenangaben wurden die Originalarbeiten benutzt, sowie auch die Handbücher von de Rossi (44), Lafar (45) und Fuhrmann (46).

des Behälters und stiegen dann allmählich zur Oberfläche auf[1]). An der Oberfläche der Flüssigkeit tritt erst nach einigen Tagen die Bildung einer Haut auf; außerdem zeigt sich eine merkliche Gasbildung.

Nach einer Woche Bebrütungsdauer wurden die Schleimklümpchen auf dem Filter gesammelt und dort gründlich gewaschen; dann wurden sie unter vorsichtiger Erwärmung mit Kalkmilch gelöst, die Lösung mit Kohlensäure gesättigt und filtriert und der Schleim dann mit Alkohol gefällt. Ein Teil der Schleimlösung wurde nach der Filtration mit ganz reinem, in Wasser gelöstem Inulin verglichen, um die möglicherweise vorhandenen strukturellen Analogien zwischen diesen beiden Polysacchariden festzustellen, die ja beide in ihrem Molekül die Lävulose enthalten [diese Analogie ist auch schon von Greig Smith (37) vermutet worden]. Beiden Lösungen wurde eine bestimmte Menge aus Sacch. fragilis (47) präparierter Inulinase zugesetzt. Während schon nach 24 Std. die Analyse (Bertrand) ergab, daß mehr als 90% des Inulins hydrolysiert worden war, konnte selbst nach 48-stünd. Aufbewahrung im Heizschrank bei 40° keinerlei Reduktion von Fehling in der Lävulanlösung festgestellt werden.



Abb. 3. Froschlaich aus Bac. vulgatus. Vergr. ½ ×.

Der mit Alkohol gefällte, mit Schwefelsäure hydrolysierte Schleim ergab linksdrehende, reduzierende Zucker und kann daher in Beziehung zum Lävulan gebracht werden, dessen Molekularstruktur ganz gewiß von der des Inulins abweicht, denn dieses letztere wird von dem hydrolysierenden Enzym nicht abgebaut.



Abb. 4. Bac. vulgatus. Vergr. etwa 500fach.

Wenn der Bazillus 1076 in Hefewasser eingeimpft wurde, das 2% der nachstehenden Verbindungen enthielt, so ergaben sich nach 10tägiger Be-

[1]) Über den Grund, weshalb die Klümpchen zur Oberfläche der Flüssigkeit aufsteigen, sind wir uns durch ihre tägliche Beobachtung völlig klar geworden; die frisch gebildeten Schleimmassen sind kompakt wie diejenigen des L. mes., aber im Verlauf der Tage beginnen sie sich zu entleeren, vielleicht infolge einer Auflösung des Schleimes und der allmählich fortschreitenden Entleerung entspricht ein langsames Aufsteigen zur Oberfläche, das durch die Bildung von Gasen begünstigt wird.

brütungsdauer bei 35° folgende Säuregrade, ausgedrückt in Kubikzentimetern N Soda auf 10 ccm Flüssigkeit:

Tabelle 3.

Arabinose	Xylose	Ramnose	Glykose	Laevulose	Mannose	Galaktose	Saccharose	Laktose	Maltose	Raffinose	Inulin	Dextrin	Gummi arabicum	Stärke	Glykogen	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salicin
1,3	0,5	0,0	2,3	2,8	2,9	2,2	2,6	0,4	2,5	0,5	0,9	2,4	0,0	0,3	0,8	0,0	0,4	0,8	0,6

In denselben Flüssigkeiten, die zur Erzeugung der Lävulose benutzt wurden, sind folgende qualitative Bestimmungen ausgeführt worden. Mit Hilfe von Ätherextraktion im Kuster-Steudel'schen Apparat und nachfolgender Destillation des Auszugs im Dampfstrom konnte Milchsäure festgestellt werden, deren Zinksalz ergab, daß es sich um die rechtsdrehende Form handelte. Die flüchtigen Säuren wurden durch Destillation im Dampfstrom nach vorhergehender Ansäuerung der Kulturflüssigkeit mit Phosphorsäure erhalten; es wurden Ameisensäure und Essigsäure festgestellt. Im Destillat ist auch die Reaktion auf Äthylalkohol positiv ausgefallen.

Alle Lävulan-erzeugenden Bakterien haben viele Eigenschaften gemeinsam: sie sind sporenbildend, aerob, Gram-positiv, verflüssigen die Gelatine, koagulieren die Milch und peptonisieren das Koagulat, reduzieren die Nitrate; all diese Eigenschaften sind ebenfalls charakteristisch für Bac. mesentericus, Bac. vulgatus und Bac. subtilis.

Die weitgehenden Analogien zwischen diesen Mikroben sind im übrigen schon wiederholt nachgewiesen worden.

In der Tat stellten Laxa (34) und Schoene (9) das Cl. gelatinosum in die Gruppe Bac. mesentericus und Bac. subtilis; Velich (48) hielt es für identisch mit B. levaniformis, von dem Greig Smith (37) selbst anerkannte, daß er Bac. mesentericus und Bac. vulgatus nahesteht und dieser Meinung schloß sich auch Owen (49) an. Maassen gab zu, daß besonders auf Grund ihrer Fähigkeit, Kasein zu peptonisieren, seine Semiclostridien den „Kartoffelbazillen" von Flügge sehr ähnlich seien. Lehmann und Neumann (50) sehen Bact. gelatinosum betae und Bac. levaniformis als dem Bac. vulgatus sehr nahe stehende Formen an. De Rossi (44) stellte in seiner Arbeit die Eigenschaften der hauptsächlichsten Erreger schleimiger Entartungen der Säfte in der Zuckerfabrikation zusammen, versuchte in ihre heteroklitischen Bezeichnungen Ordnung zu bringen und stellte die Behauptung auf, daß es „noch zweifelhaft erscheine, ob Clostr. gelatinosum nicht ohne weiteres mit Bac. levaniformis identifiziert werden könnte und ob nicht sowohl das eine wie das andere und selbst auch der Bac. gelatinosus (von Glaser) und die unrichtigerweise von Maassen als Semiclostridien bezeichneten Mikroben in Wirklichkeit als einfache Varietäten von Bac. subtilis und Bac. vulgatus aufzufassen seien."

Pribram (51) identifiziert Clostr. gelatinosum Laxa mit Bact. gelatinosum betae und bildet aus diesen beiden Arten die einheitliche Varietät Bac. vulgatus.

Es könnte noch mehr Literatur zitiert werden, es wird aber vorgezogen, auf die Tab. 4 zu verweisen, in der auf breiter Basis die gemeinsamen Eigenschaften aufgeführt sind, die sowohl den Bazillus 1076 als auch die wichtigsten als Schleimbildner in der Zuckerfabrikation bekannten Bazillen mit dem Bac. vulgatus verbinden.

Wenn die hauptsächlichsten Eigenschaften, die von den verschiedenen Autoren zur Begründung ihrer Arten oder womöglich sogar der Gattungen, zu deren Aufstellung sie sich berechtigt hielten, herangezogen wurden, eine nach der anderen einer genauen Prüfung unterworfen werden, so sieht man, daß vielen nur ein sehr zweifelhafter diagnostischer Wert zugesprochen werden kann.

Nach Glaser unterscheidet sich das Clostr. gelatinosum betae von anderen Formen dadurch, daß es Alkohol und keine Säuren produzieren kann; daß es sich in 10 proz. Melasse nicht entwickelt; daß der von ihm erzeugte Schleim dem Dextran ähnlich ist. Maassen weist auf die große Fähigkeit des Semiclostr. zur Ammoniakbildung hin, in deren Kulturflüssigkeiten nach 3 Wochen bei 45° die Reaktion gewöhnlich schwach sauer ist. Dieses Verhalten haben wir bei Bac. 1076 bestätigen können, der in alten Kulturen die Substrate oft vollkommen alkalisch gemacht hat; wenn derartige Kulturflüssigkeiten destilliert werden, so fällt nur die Alkoholreaktion positiv aus. Daß es nicht gelang, das Bakterium in 10 proz. Melasselösung zu züchten, ist nicht weiter überraschend, wenn man bedenkt, daß dieses Beiprodukt von sehr verschiedener Zusammensetzung sich oft als ungeeignet auch zur Entwicklung von weniger anspruchsvollen Mikroben erweist. Schließlich und endlich ist die Beziehung des von Glaser untersuchten Schleims zum Dextran nur auf Grund seines Aussehens aufgestellt worden und auf Grund der den beiden Polysacchariden gemeinsamen chemischen Eigenschaften, es fehlt aber eine Angabe über die Art der Drehung der Lösungen nach der Hydrolyse.

Das Aussehen der unter mäßiger Luftzufuhr gebildeten Sporen stellt die charakteristischste Eigenschaft für das Genus Semiclostridium dar. Die geringe diagnostische Bedeutung dieser Eigenschaft wurde schon im wesentlichsten von Bredemann (52) hervorgehoben, der in seiner Untersuchung über Bac. amylobacter den außerordentlichen Formenreichtum der Sporangien in den normalen Kulturen veranschaulicht; diese Variabilität ist allen anaeroben und aeroben Sporenbildnern eigen. Auch das mangelnde Vermögen, Buttersäure aus Zuckern und Laktaten zu erzeugen, genügt nicht, um diese Bakterien von Bac. vulgatus abzutrennen, denn es ist bekannt, daß für diese Mikroben die Bildung dieser Säure nur eine Folge des Abbaus der Eiweiße ist [Lafar (53)] und nicht der Zucker oder der Salze organischer Säuren.

Wenn wir zu all dem, worüber wir referiert haben, nun noch die Unbeständigkeit vieler morphologisch-chromatischer und züchtungsmäßiger Eigenschaften in Betracht ziehen, die schon wiederholt bei den sporenbildenden Aeroben dieses Typus festgestellt worden sind und uns an die Labilität gewisser durch äußere Reize entstandener Variationen erinnern[1]), so scheint es uns berechtigt, den Bazillus 1076 ohne weiteres mit dem Bac. vulgatus zu identifizieren; aber nicht nur das, sondern wir glauben auch vorschlagen zu müssen, daß dieser Art die hauptsächlichsten Schleimbildner, die in Säften der Zuckerfabriken isoliert worden sind, zugeteilt werden: Bact. gelatinosum betae Glaser, Clostr. gelatinosum Laxa, Semiclostr. commune Maassen und Bac. levaniformis G. Smith. Die unzureichende Beschreibung des Bact. pediculatum Koch et Hosaeus, des Bact. viscosus sacchari Kramer und des Mixobacillus Betae von Gonnermann läßt keinerlei Urteil über die verwandtschaftlichen Beziehungen, die möglicherweise zwischen diesen Mikroben und anderen Schleimbildnern bestehen, zu.

Die außerordentliche Bedeutung der schleimbildenden Bazillen als Ursache von Entartungen in den Säften der Zuckerfabriken scheint uns aus allem, was wir berichtet haben, klar hervorzugehen.

[1]) Laxa (34) beobachtete, daß Kolonien, die aus Sporen stammten, welche eine längere Einwirkung hoher Temperaturen durchgemacht hatten, vollkommen verschieden waren von denen, die er normalerweise von seinem Clostridium gelatinosum erhielt, zu welchem Typus sie jedoch nach einer Reihe von sechs Durchgängen wieder zurückkehren.

Diejenigen Bazillen. die ubiquitär sind, Sporen von ganz außerordentlicher Widerstandsfähigkeit[1]) und überraschender Langlebigkeit besitzen[2]), thermophil sind, wenig anspruchsvoll hinsichtlich ihrer Ernährung, sind zweifelsohne ganz vorzüglich ausgerüstet, um in den in Verarbeitung befindlichen Säften ihre physiologische Tätigkeit zu entfalten, die dann zu direkten oder indirekten Verlusten an Saccharose führen.

Blastomyzeten.

Obgleich die Mehrzahl der Autoren auf die ständige Anwesenheit von Blastomyzeten in den Gallertballen der Zuckerfabriken hinweist, so sind doch die Kenntnisse, die wir über diese Mikroorganismen besitzen, noch recht bescheiden.

Der am besten bekannte soll zuerst beschrieben werden; es ist der Saccharomyces Zopfi, der 1897 von Artari (55) zusammen mit L. mes. in einem Saft der Zuckerfabriken festgestellt wurde; diese Hefe ist dann später von Owen (56) wiedergefunden und untersucht worden.

Gemäß Artari sind die Ansprüche des S. Zopfi in bezug auf Stickstoffernährung sehr gering, denn er begnügt sich mit Ammoniumsulfat; er ist in der Lage, den Kohlenstoff aus Saccharose, Glykose und Mannit auszunutzen, aber nicht aus Maltose, Laktose, Galaktose, Inulin und Melampyrit. Diese Hefe ist als die erstmalig beschriebene „osmophile“ anzusehen, denn Artari selbst hat ihr die Fähigkeit zuerkannt, in Zuckerlösungen von 60 g auf 100 ccm weiterzuleben. Sie vergärt Saccharose, aber weder Maltose noch Laktose. Ihre elliptischen oder sphaerischen Zellen stellen Querwände dar, die an Saccharomycodes erinnern, wenn er in 5—8 proz. Schwefelammoniumlösungen gezüchtet wird. Die vegetativen Zellen vermögen eine halbe Stunde lang eine Temperatur von 130° bei trockener Hitze und von 66—67° bei feuchter Hitze zu ertragen. Owen hat beobachtet, daß der Umfang der Zellen entsprechend den Schwankungen der Dichtigkeit des Mediums, in dem sich die Zellen entwickelt haben, schwankt und daß eine direkte Proportion zwischen Dichtigkeit der Flüssigkeit, Dichtigkeit des Zellplasmas und Thermoresistenz besteht, so daß, wie er sagt, anzunehmen ist, daß ganz allgemein die Hitzebeständigkeit der Sporen von der erhöhten Dichtigkeit ihres Plasmas herrührt. Kossowicz (57) hat in gewissen, aus einer ungarischen Zuckerfabrik stammenden „Froschlaichen“ außer L. Opalenitza und Cladotrix dichotoma eine ganze Anzahl elliptischer Hefen, die der Gattung Saccharomyces angehören, beobachtet.

Aus dem „Froschlaich“, aus dem die vorher beschriebenen L. mes. und Bac. vulgatus stammten, wurde eine Hefe isoliert, deren Untersuchung nach Stelling-Dekker (58) ergab, daß sie auffallende Ähnlichkeit mit der Hefe besäße, die von Sacchetti aus „Stracchino“-Weichkäse isoliert und als Saccharomyces cartilaginosus Lindner (59) beschrieben worden ist. Seine Sprossungszellen weisen in der Tat die ausgesprochene Körnigkeit und die charakteristische Winkligkeit auf, welche den über die ganze Oberfläche verteilten Ansatzstellen der sehr reichlich gebildeten Knospen ihre Entstehung verdankt; die Riesenkolonien haben ein gekröseartiges Aussehen und nach 3 Wochen erscheinen in Kölbchen mit Würze an der Oberfläche Inselkolonien; sie vergärt: Glukose, Lävulose, Mannose, Galaktose, Saccharose, Maltose und z. T. Raffinose; sie ist inaktiv gegen Milch; sie assimiliert keine Nitrate;

[1]) Alle Autoren haben einstimmig die unerhörte Widerstandsfähigkeit der Sporen des Bac. vulgatus und der anderen mit ihm identifizierten Schleimbildner hervorgehoben; diese werden selbst bei einer Kochdauer von 10 Std. nicht getötet.

[2]) De Rossi berichtet, daß Nester (54) lebensfähige Sporen von Bac. vulgatus in Bodenproben gefunden hat, die über 90 Jahre lang aufbewahrt worden waren.

sie ist sporenbildend. Es ist interessant, darauf hinzuweisen, daß diese Hefe zuerst von Matthes aus Kefirkörnchen isoliert wurde und daß ihr Nachweis in „Froschlaich“ und in den Weichkäsen Fälle unzweifelhafter Assoziation dieses Saccharomyzeten mit Milchfermenten von verschiedenem Typus und in grundlegend verschiedenen Stoffen darstellt, was eine ganz besonders große Affinität zwischen Sacch. cartilaginosus und den Milchfermenten wahrscheinlich macht. Außer der beschriebenen Hefe ist ein Zygosaccharomyces isoliert worden, der dem Z. Marxianus (Hansen) Guilliermond et Negroni sehr nahesteht, da es sich dabei aber nur um vereinzelte Feststellungen handelt, so erscheint es zweifelhaft, ob es sich hier nicht nur um eine Form handelt, die gelegentlich in einen Schleim geraten ist und sie soll daher an anderem Ort beschrieben werden.

Indizien für Symbiose zwischen den Mikroben der Schleime.

Obwohl fast alle Autoren die beständige, gleichzeitige Anwesenheit sowohl von Kokken und Bazillen, als auch von Hefen in den Schleimen der Zuckerfabriken angeben, so wird doch die Schleimbildung jeweils nur der Tätigkeit einmal des einen, einmal des anderen Typus von Bakterien zugeschrieben. So berücksichtigen die einen Autoren ausschließlich die Kokken, während andere sich veranlaßt sehen, zu behaupten, daß nur die bazillären Formen wirklich einen Einfluß auf das Zustandekommen der Schleime in den Zuckerfabriken haben und Laxa (34) äußert sogar den Verdacht, daß die Zoogleen seines Clostr. gelatinosum häufig mit denen des L. mes. verwechselt worden seien, welch letzteres zu isolieren diesem Autor niemals geglückt ist.

Man darf wohl behaupten, daß dieses Auseinandergehen der Meinungen nicht so sehr auf tatsächliche Schwankungen in der Mikrobenflora der untersuchten „Froschlaiche“ zurückzuführen ist, wie, und zwar hauptsächlich auf die Verschiedenheit der zur Anreicherung der Kulturen und zur Isolierung angewendeten Methoden, welche, wie vorher gesagt wurde, einen entscheidenden Einfluß darauf haben, ob der eine oder der andere Mikrobe als vorherrschend angesehen wird. Und da sowohl die Kokken wie auch die Bazillen tatsächlich Schleimbildner sind, so sind die auseinandergehenden Ansichten erklärlich. Was dabei aber wundernimmt, ist die Tatsache, daß angesichts der wiederholt bestätigten gleichzeitigen Anwesenheit verschiedener Typen von Mikroorganismen im Innern der schleimigen Bildungen es niemandem eingefallen ist, nun einmal festzustellen, welche Beziehungen zwischen den Formen bestehen, aus denen sich die mikrobische Flora des „Froschlaiches“ normalerweise zusammensetzt.

Ohne behaupten zu wollen, daß wir die Aufgabe, die wir uns gestellt hatten, vollständig gelöst haben, möchten wir hier doch über einige Beobachtungen berichten, die zur Bekräftigung der Hypothese beitragen können, daß zwischen den 3 Typen von Mikroben, die sich aus den Schleimen der Zuckerfabriken isolieren lassen, den Milchsäurekokken, den aeroben, sporenbildenden Bazillen und den Saccharomyzeten Beziehungen symbiotischer Natur bestehen.

1. Es scheint festzustehen, daß nur Glykose und Laevulose in „statu nascendi“, d. h. in dem Augenblick, in dem die Inversion der Saccharose durch die Mikroben vollzogen ist, zur Synthese in die betreffenden Polysaccharide, das Dextran und das Laevulan, befähigt sind. Wenn nun die Erscheinungen, die sich aus der Beifugung von Schleimklümpchen, in denen eine echte Mikrobengemeinschaft besteht, zu Rohsaft ergeben, einer erneuten Beobachtung unterzogen werden, so kommt man

zu der Annahme, daß die niedrige Azidität, die nach viertägiger Bebrütungsdauer bei 40° sich zeigt und die verhältnismäßig geringe Zunahme an reduzierenden Zuckern — es erwies sich, daß diese etwa zu gleichen Teilen aus Laevulose und Glykose bestanden — Folgeerscheinungen der vollständigen Umwandlung des aufgespaltenen Rohrzuckers in die Hexosen, aus denen er sich zusammensetzt, die respektiven synthetischen Polysaccharide sind. Diese Hypothese scheint auch durch die erheblichen Abweichungen, die in den Angaben über das Drehungsvermogen der Schleime zwischen den verschiedenen Autoren bestehen[1]), unterstutzt zu werden, Abweichungen, die darin ihren Grund haben könnten, daß neben einem der beiden Polysaccharide, das sich in erhöhter Menge gebildet hat, sich auch eine mehr oder weniger große Menge des anderen gebildet habe.

2. Wir wollten feststellen, welchen Einfluß bestimmte dem Bac. 1076 zur Verfügung gestellte Kohlehydrate auf seine Vermehrung und auf sein Verhalten gegenüber dem Dextran hätten. Wir haben ihn zu diesem Zweck mit möglichst gleichen Quantitäten von Impflösungen mit 2% Glykose, Saccharose, Dextrin und Dextran, in Hefewasser, eingeimpft und festgestellt, daß die Oberflächenvegetation in Dextrin und Dextran ausgesprochen üppiger war, bei einer dem Molekulargewicht des Kohlehydrats, das sich im Lösungsmittel befand, genau proportionalen Steigerung. Das läßt vermuten, daß der Bac. vulgatus in seinem natürlichen Vorkommen mit Leuc. mes. die von diesem erzeugten Polysaccharide als ausgezeichnete kohlehydrathaltige Nährstoffe ausnützen kann.

3. Mit ihrem Sauerstoffbedurfnis verbessern Sacch. cartilaginosus und Bac. vulgatus zweifellos die Lebensbedingungen für L. mes., der bekanntlich einen anaeroben Lebensraum vorzieht.

4. In der nachstehenden Tab. 5 geben wir die Schwankungen im Säuregrad in den verschiedenen mit Bac. 1076 in Reinkultur geimpften Kulturflüssigkeiten an, ebenso die bei Impfung mit Bac. 1076 zusammen mit L. mes. und ferner die mit letzterem in Reinkultur. In der Tab. 5 wird das große Vermögen zur Ammoniakbildung des Bazillus veranschaulicht, das sich in der fortschreitenden Abnahme des Säuregrades, den er selbst in der Kulturflüssigkeit erzeugt hatte, äußert. Man erkennt aber auch, daß die Schwankungen in der Azidität in Gemischtkulturen zwischen diesem Bazillus und dem L. mes. deutlich durch die Anwesenheit des ersteren beeinflußt werden, der sozusagen als Puffer im Substrat fungiert, und auf diese Art grundlegende Veränderungen in den Lebensbedingungen der Milchfermente hervorruft.

Tab. 5. Festgestellter Verbrauch von ccm n/10 NaOH einer 10 proz. Saccharoselösung in Hefewasser bei Aufbewahrung im Thermostat bei 35°.

	Nach Tagen:									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Bac. vulgatus 1076	2,8	4,0	4,5	4,6	4,3	3,9	4,1	3,7	3,5	3,2
Leuc. mes. 1137	4,6	7,9	7,8	7,7	7,9	7,6	7,7	7,9	7,6	7,5
Leuc. mes. 1137 + B. vulg. 1076	3,5	3,8	4,1	4,4	4,3	4,6	4,9	5,0	4,9	5,1

5. Die schon wiederholt für L. mes. festgestellte Schutzwirkung der Schleime (schon Liesemberg und Zopf fanden, daß verkapselte Formen 5 Min. lang eine Temperatur von 100° — trockene Wärme — vertragen können, während nakte Formen einer Erhitzung auf 75° im gleichen Zeitraum unterliegen) erstreckt sich zweifelsohne auch auf die im „Froschlaich“ vorhandene Hefeart. In der Tat sind die Kulturen des vorher beschriebenen S. cartilaginosus aus Schleimklümpchen isoliert worden, die zuvor $^1/_4$ Std. lang auf 75° erhitzt worden waren, während diese Hefe eine sehr viel geringere Hitzeresistenz schon beim dritten Durchgang in Ausstrichen in Agarwürze bewiesen hat. Wenn der — sporenfreie — Mikrobenfilm dieser

[1]) Beijerinck (15) stellt den Werten, die von den verschiedenen Autoren für das Drehungsvermögen des Dextrans und des Laevulans angegeben werden, diejenigen entgegen, die er selbst in den von Lactococcus dextranicus, von Bac. mesentericus und von Bac. emulsionis erzeugten Schleimen festgestellt hat. Für Dextran werden angegeben: $\alpha D = + 227°,7$; $+ 285°,7$; $+ 200°,5$; $+ 195°$ (Beijerinck); $+ 125°$. Für das Laevulan $= \alpha D - 221°$; $- 20°$; $- 40°$ (Beijerinck); $- 80°$.

Kulturen einer Auflösung von Glykose in Hefewasser hinzugefügt und auf Provetten verteilt wird, die 10 Min. lang einer jeweils um 1° zunehmenden Temperatur zwischen 50 und 75° ausgesetzt werden, so hort seine Fähigkeit, eine Garung zu erzeugen, in allen den Gläsern auf, die eine Erwärmung über 62° hinaus erfahren haben. Wir haben nicht feststellen können, ob diese Erscheinung auf dem Vorhandensein des Schleims beruht oder vielleicht der von Schoenfeld und Rommel (60) beobachteten analog ist — Owen weist daraufhin, daß diese Autoren eine außerordentliche Hitzebeständigkeit bei einer Hefe feststellten, die sich lange Zeit gemeinsam mit Milchsäurefermenten entwickelt hatte.

6. Daß die Hefen einen entscheidenden Einfluß auf die Milchfermente ausüben, ist schon seit Koroleffs (61) Untersuchungen bekannt, der beobachtete, daß Streptokokkenkulturen, die sich im Verlauf von 3 Wochen selbst sterilisieren, sich hingegen für mehr als 6 Monate unter den gleichen Lebensbedingungen lebensfähig erhalten können, wenn sie mit einer Hefe zusammen aufbewahrt werden. Da uns daran lag, festzustellen, ob L. mes. aus der Anwesenheit der Mikroorganismen, mit denen er normalerweise gemeinsam vorkommt, ebenfalls Nutzen ziehen könnte, haben wir ihn in folgenden Kulturen gezüchtet: A. 0,5% Glykoselösung in Hefewasser ohne und B. mit Beigabe von Calciumkarbonat; C. Stichkulturen in Hefewasser + 0,5 Pepton Witte + 0,2% K_2HPO_4 + 0,01% $MgSO_4$ + 0,25% Glukose + 2% Agar; D. Stichkulturen in Hefewasser wie oben + 15% Gelatine. In den Lösungen A und B ist L. mes. in Reinkultur und zusammen mit Bac. vulgatus und S. cartilaginosus gezüchtet worden. Die Stichkulturen waren natürlich rein.

Die Kulturen auf Agar D sind fast 6 Monate lang im Kühlschrank bei + 2 bis + 5° lebensfähig geblieben; die in Gelatine waren nach 1 Monat nicht mehr fortpflanzungsfähig; in den Lösungen A und B waren die Reinkulturen nach 1 Monat steril, während in den Mischkulturen von L. mes. mit Bac. vulgatus noch bis zum Ablauf des 2. Monats Kolonien beider Mikroorganismen erzielt werden konnten. In Mischkulturen zwischen L. mes. und S. cartilaginosus kam es noch zu Koloniebildungen beider Mikroorganismen nach mehr als 10monatiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur, die im Sommer 30° überstieg.

Die Anwesenheit der Hefe ist also nachweislich vorteilhaft für L. mes., da seine Lebensfähigkeit auch unter Umweltbedingungen, die für ihn in Reinkultur nach wenigen Tagen tödlich sein würden, durch die Anwesenheit der Hefen, mit denen er auch unter natürlichen Lebensbedingungen vergesellschaftet ist, ganz außerordentlich verlängert wird.

7. Wenn wir sie mit unseren Arbeitsmethoden bis jetzt auch noch nicht haben sicher bestätigen können, so möchten wir doch die Ergebnisse von Karaffa-Korbutt (62) nicht mit Stillschweigen übergehen; dieser Autor hat im Verlauf seiner Untersuchungen über die Symbiose zwischen Bakterien und Blastomyzeten, gleichzeitig und soweit wie möglich unter den gleichen Bedingungen, verschiedene Bakterien gezüchtet, unter anderen auch Bac. mesentericus vulgaris, zusammen mit einigen Torulen und mit Sacch. cerevisiae gezüchtet und kommt zu dem Schluß, daß die Symbiose zwischen Blastomyzeten und Bakterien die Fähigkeit zur Erzeugung von Polysacchariden erhöht.

Wie vorauszusehen war, sind die Beobachtungen, die wir bisher machen konnten, noch recht weit davon entfernt, die Wechselwirkungen und Beziehungen zwischen den verschiedenen, gemeinsam in den Schleimen der Zuckerfabriken lebenden Mikroorganismen völlig zu klären, dennoch scheinen sie unleugbar ausreichend, um die Hypothese aufzustellen, daß die spontan in den Zuckerrübensäften in Verarbeitung auftretenden Erscheinungen im allgemeinen von einem Komplex von Mikroben abhängen und nicht von nur einem einzigen Bakterium, und daß auch hier, wie in der Mehrzahl der Umformungsvorgänge organischer Substanz, die sich in der Natur vollziehen, verschiedene Mikroorganismen gleichzeitig oder in metabiotischer Aufeinanderfolge die Aufgaben erfüllen, die ihnen im Kreislauf der Materie zugeteilt worden sind.

Mechanismus der Schleimbildung.

Das synthetische Vermögen der Mikroben des „Froschlaiches" hat natürlich die Forscher besonders beschäftigt, die sich bemüht haben,

festzustellen, unter welchen Bedingungen die Verdichtung der Zucker, die dann zur Bildung der Schleime führt, vor sich geht.

Scheibler (63) hat zwar den mikrobiellen Ursprung des „Froschlaich" geleugnet, aber wohl beobachtet, daß sich besonders dann Dextran bildete, wenn unreife Zuckerrüben verarbeitet wurden oder solche, die reichlich mit Stickstoffdünger gedüngt worden waren. Liesemberg und Zopf (2) sagten, daß L. mes. sich nur in geeigneten Substraten in die charakteristischen Kapseln einhüllt und vermuteten, daß er sich in der Natur in nackter Form vorfinde. Schoene (9) behauptete, daß die normalen Arbeitsbedingungen in der Zuckerfabrikation die Schleimbildung hemmten, die weitgehend von den Temperaturverhältnissen und dem Salzgehalt abhängig ist. Zettnow (10) stellte fest, daß der Schleim sich nur aus Saccharose, nicht aber aus Laevulose oder Glukose bildete, und auch nicht aus einer äquimolekularen Mischung beider Zucker. Beijerinck (39) fand, daß Laevulan aus Lösungen von Saccharose und Raffinose durch Bakterien von so allgemeiner Verbreitung wie B. mesentericus, B. megatherium und besonders B. emulsionis gebildet werden kann und dieser Autor folgerte, daß die Bildung dieses Polysaccharids darauf beruht, daß die Bakterien ein Enzym absondern, die Viskosaccharase, und daß es sich hier um den ersten Fall eines synthetisierenden Enzyms handele, das außerhalb der Zelle wirksam wird. Greig Smith (37) stellte die Behauptung auf, daß die Schleimbildung durch B. levaniformis der Menge Pepton, die ihm zur Verfügung gestellt wird, direkt proportional ist. Maassen (3) fand, daß die Laevulanbildung dann am größten wird, wenn die Saccharoselösung bis auf eine einer ca. 0,1 proz. Sodalösung entsprechende Alkalität gebracht wird. Fernbach und Schoen (38) bestätigten im Verlauf ihrer Untersuchungen über Laevulanbildung durch einen „Gommobacter" und Dextranbildung durch Leuc. dextranicus Beij. die Beobachtungen von Zettnew und stellten die Hypothese auf, daß sich die Polysaccharide nur in Gegenwart der betreffenden Hexosen in statu nascendi bilden können[1]) und daß die Schleimbildung aus Saccharosen, die vorher mit Säuren oder Saccharasen hydrolisiert wurden, ausbleibt. Orla-Jensen (4) gab an, daß alle Milchsäurebakterien im ersten Stadium verkapselt sind und daß die Kapseln in den Betakokkusarten außerordentlich großen Umfang annehmen können, wies aber darauf hin, daß diese Fähigkeit außerordentlich schwankt. Diesem Autor zufolge kann die Schleimbildung in Zuckerlösungen in zwei verschiedenen Formen auftreten, und zwar entweder in der Flüssigkeit gelöst oder zu Krümchen geballt, die sich am Grunde des Gefäßes sammeln. Verschiedene Autoren bestätigten, daß Calcium- und Natriumchlorid, Natriumnitrat und Calciumkarbonat die Schleimbildung begünstigen. Koch (24) kam anläßlich seiner Forschungen über die Speichelstreptokokken, die er mit L. mes. identifiziert, zu der Vermutung, daß in den aufeinanderfolgenden Durchgängen in künstlichen Substraten auch schleimbildende Formen die Fähigkeit zur Hüllenbildung verlieren und nahm an, daß dieses darauf zurückzuführen sei, daß die üblichen bakteriologischen Nährböden irgend etwas enthalten, was die Kapselbildung verhindert oder sie sogleich nach ihrer Bildung wieder zerstört. Er behauptete ferner, daß es ihm gelungen sei, sowohl den in Nacktformen übergegangenen Stämmen von L. mes. als auch denen der „Speichelstreptokokken" die Fähigkeit zur Schleimbildung wiedergeben zu können, wenn sie einem Verfahren unterworfen werden, das der Autor wie folgt beschrieb: in einem Raum mit annähernd konstanter Temperatur (18—22°) wird ein Apparat aufgestellt, der einen Tropfenfall von mit destilliertem Wasser verdünnten Dicksaft (Verh. 1 : 3), der mit L. mes. infiziert ist, in regelmäßigen Intervallen auf ein sterilisiertes Brett gestattet. Nach mehreren Tagen beobachtet er eine deutliche Schleimbildung, in der die Hüllenform derjenigen des spontan gebildeten „Froschlaichs" sehr ähnlich war. Neuerdings bringen Kagan (64) und Nepomniashchaia (65) die schleimbildende Fähigkeit von L. mes. in Beziehung zu den modernen Ansichten über die Variabilität der Mikroben und behaupten, daß in den drei dissoziierten Formen S, O und R das Schleimbildungsvermögen deutlich verschieden und der Intensität der Abscheidung von Saccharase durch diese drei Formen direkt proportional ist; demgemäß bringt S, das ärmer an Saccharase ist, keinerlei Schleim hervor; die Form O besitzt das größte Inversionsvermögen und macht die Saccharoselösungen gleichmäßig trübe und schleimig durch die Bildung löslicher Schleime; die Form R, deren Inversionsvermögen in der Mitte zwischen denen der vorstehenden Formen liegt, erzeugt den typischen „Froschlaich".

[1]) Schoen findet in dieser Tatsache eine Bestätigung für das Vorkommen der Form γ der Glukose und Laevulose. Siehe seine Monographie „Le problème des fermentations" (Paris 1926).

Das wäre die Zusammenstellung unserer Kenntnisse über die Ursachen der Schleimbildung, in deren jeder ein Körnchen Wahrheit stecken mag. Jedoch ist keine einzige der aufgestellten Hypothesen imstande, allein den Mechanismus der Bildung von Schleimen, wie sie in den Zuckerfabriken in Erscheinung tritt, zu erklären. Wie schon gesagt, ist besonders die Tatsache frappierend, auf die ja auch viele Autoren hinweisen und die allen Technikern in dieser Industrie bekannt ist, daß die Schleime urplötzlich, und zwar in recht ansehnlichen Mengen auftreten können, ohne daß die physikalischen und chemischen Bedingungen für die Säfte oder die Verarbeitungsweise sich irgendwie geändert hätten.

Daher erscheint die Annahme durchaus berechtigt, daß sowohl die Kokken, wenigstens ihre nackten Formen, wie auch die Bazillen und die Hefen, immer in den Zuckerfabriken anwesend seien. Doch welches sind dann die physikalischen, chemischen, physiko-chemischen Bedingungen oder welches die Ursachen biologischer gegenseitiger Mitarbeit, die sie zur plötzlichen Steigerung ihrer Lebensregungen und zur Aktivierung ihres schleimbildenden Vermögens anregen?

Ganz gewiß sind die Temperaturverminderung in den Säften, ihre mäßige Alkalität und das Vorhandensein des Minimums von Nährstoffen in ihnen, das für die Vermehrung der Mikroben unerläßlich ist, die „conditio sine qua non“ für die Schleimbildung. Zudem scheint diese Erscheinung noch von anderen Faktoren beherrscht zu werden, deren gründliche Kenntnis sichere Vorbeugungsmaßnahmen geben dürfte, diese gefährliche Einmischung der Mikroben auch in die Arbeitsgänge, für die ein merklicher Abfall der Temperatur in den Säften erforderlich ist, zu verhindern.

Wir haben also eine Reihe von vorläufigen Versuchen angefangen, mittels deren wir die Richtigkeit dessen, was andere Autoren zu der Frage beigebracht haben, nachprüfen und zugleich einen Überblick über möglicherweise vorhandene „andere Elemente“ gewinnen wollten, die auf die spontane Bildung von „Froschlaich“ von Einfluß sind.

Wir berichten nachstehend kurz über die erzielten Ergebnisse und sind uns vollkommen klar, daß diese zwar einerseits den Wert der bisher aufgestellten Hypothesen teils bestätigen, teils jedoch widerlegen, daß wir aber anderseits keinen rechten Erfolg zu verzeichnen haben, denn es ist uns insbesondere nicht gelungen, die Bedingungen herauszufinden, unter denen der Übergang der Kokken von den nackten Formen zu den mit Hüllen umgebenen stattfindet.

Was nun die Lävulanbildung anbetrifft, so ist der Verlauf der Dinge ziemlich klar, denn Bac. vulgatus erhält sich seine synthetisierende Fähigkeit ziemlich unverändert auch nach zahlreichen Passagen, denen er unterworfen wird; um eine ausgiebige Lävulanbildung zu erreichen, genügte es, mit Nährlösungen zu arbeiten, die Saccharose enthielten, und alkalisch gemacht worden waren, wie Maassen vorschlägt, und bei Temperaturen von nahezu 40° zu arbeiten, d. h. also unter Bedingungen, die sich bei der Zuckerfabrikation leicht verwirklichen lassen.

Das trifft jedoch für L. mes. nicht zu, dessen Synthetisierungsvermögen sich unter den Versuchsbedingungen als außerordentlich labil erwiesen hat. In der Tat haben sowohl die Stämme, die aus den Schleimen von Zuckerfabriken stammten, als auch die aus Feigen isolierten, die anfänglich große Mengen von Dextran erzeugten, nach einer mehr oder weniger großen Zahl von Durchgängen auch in solchen Substraten, die als besonders geeignet

zur Erhaltung des Schleimbildungsvermögens angesehen werden, ihre Umhüllungen eingebußt und die Fähigkeit zur Bildung der charakteristischen Schleime in Saccharoselösungen verloren. Wir haben uns vergeblich bemuht, in diesen Stämmen die ursprüngliche synthetisierende Fähigkeit wieder anzuregen, indem wir den Saccharoselosungen Natrium- und Kalziumchlorid, Natriumnitrat und Kalziumkarbonat zusetzten; den gleichen Mißerfolg hatten wir mit Zusatz von durch Auspressen und Berkefeld-Filtration erhaltenem Zuckerrubensaft, mit Rohsaft, Dunnsaft und Dicksaft in verschieden starken Verdunnungen. Ebensowenig erfolgreich war die Anwendung der von Koch fur Speichelstreptokokken befolgten Methode, die nur dahingehend abgeändert wurde (zum Auffangen der aus einem mit Wattebausch verschlossenen Tropftrichter herabfallenden Dicksafttropfen diente der Boden eines großen Erlenmeyer-Kolbens, der durch ein Wattefilter Kontakt mit der Luft hatte; alles wurde naturlich vorher im Autoklav sterilisiert). Wir kamen zu keinem Resultat, wenn wir unter verschiedenen Züchtungsbedingungen den L. mes. entweder mit dem Bazillus oder mit der Hefe oder mit beiden gleichzeitig zusammen brachten; wurden den Nährflüssigkeiten oder den Zuckersäften Substanzen zugesetzt, die die Vegetation der Milchsäurebakterien fordern, wie autolysierte Hefe oder Tomatensaft, so blieb auch das ohne jeden Einfluß auf die Schleimbildung. Ergebnislos blieb auch eine lange Reihe von Versuchen, bei der die stickstoffreiche Nahrung, die Zuckerkonzentration (von 10—40%), die Temperatur (von 15—40°), die Reaktion der Lösungen (p_H von 5—9) und die Frischluftzufuhr jeweils abgeändert wurden.

Jedenfalls beweisen die Ergebnisse der vorstehenden Versuche: 1. daß durch die künstliche Zuchtung in unseren Stämmen von L. mes. die schleimbildende Fähigkeit verschwunden ist und auch durch die Mittel, die sie sonst anregen, wie Züchtung in Zuckerrübensaft oder Zusatz von Chloriden, Nitraten und Kalzium, weder erhalten, noch wiedererweckt werden kann; 2. daß Züchtung in verdünntem Dicksaft und Abtropfverfahren, die Koch fur ausreichend hielt, um die Nacktform in die umhüllte Form überzuführen, unter unseren Versuchsbedingungen nicht die erfreulichen Resultate wie bei dem deutschen Autor ergeben haben; 3. daß sich unter den zahlreichen und verschiedenartigen chemischen, physikalischen und physiko-chemischen Bedingungen, in die wir L. mes. gebracht haben, niemals die speziellen Eigenheiten des Lebensraums verwirklicht haben, die in der Natur diesem Mikroben die schleimbildende Fähigkeit erhalten oder wiedergeben; 4. und daß infolge des raschen Nachlassens dieser unbedingt erforderlichen Eigenschaft in unseren Kulturen uns die Möglichkeit fehlte, Versuche im Sinne der Arbeiten der ukrainischen Autoren auszuführen. Die Existenz der von jenen in Leuc. mes. gefundenen dissoziierten Formen würde den Verlauf des Synthetisierungsvermögens in künstlichen Kulturen erklären und zu der Schlußfolgerung führen, daß die Lebensbedingungen in solchen Kulturen zu einem ähnlichen Überhandnehmen der nicht schleimbildenden Form S führen; es bliebe jedoch immer noch völlig ungeklärt, welche Faktoren die Zuckersäfte in Verarbeitung ganz plötzlich geeignet zur überwiegenden Bildung der Form R machen, der Erzeugerin des typischen „Froschlaichs".

Ehe wir diese Arbeit abschließen, wollen wir noch auf die Bedeutung der schleimbildenden Bakterien als Ursache von wirklichen oder scheinbaren Verlusten an Saccharose in der industriellen Zuckerfabrikation hinweisen.

Sehr viel bedenklicher als der invertierende Einfluß — der leicht festzustellen und daher rechtzeitig abstellbar ist — ist die Erzeugung der Schleime. Wenn diese Polysaccharide sich in unlöslichen Klumpchen zusammensetzen, so geht nicht nur die Saccharose verloren, aus der sie entstanden sind, sondern noch sehr viel mehr durch die Verstopfung der Rohren, die Schwierigkeiten bei der Filtration usw., die sich unweigerlich daraus ergeben. Diese Erscheinungen werden jedoch nicht unerkannt bleiben und ein rasches Eingreifen macht sie zunichte. Die synthetisierende Tätigkeit der Mikroben hat noch viel unheilvollere Wirkungen, wenn sie mehr im Verborgenen und abgeschwächt vor sich geht, denn dann kann sie sich lange Zeit unerkannt erhalten. Das ist der Fall, wenn die Betriebsbedingungen die Bildung von Schleimen in der löslichen Form begünstigen oder wenn die Klümpchen, die sich vor der Scheidung gebildet haben, sich verflüssigen — durch die vereinte Wirksamkeit von Kalzium und Hitze — im Verlauf der Scheidung selbst.

Die Schleime, die optisch aktiv sind und sich mit Fehling nicht nachweisen lassen, ändern die Polarisation der Säfte und können insbesondere, wenn sie sich in den Melassen anhäufen, eine nicht unbeträchtliche Menge von Saccharose verborgen halten, die notwendigerweise unter die unbestimmbaren Verluste eingerechnet werden muß.

Wohryzek (66) führt einige Beispiele aus alten Versuchen an, die gleichfalls das sichergestellte Vorhandensein dieser Schleime mikrobiellen Ursprungs auch in den optisch aktiven Nichtzuckern der Säfte und Melasse beweisen; wir zögen nicht die Aufmerksamkeit der Techniker und der Forscher in der Zuckerindustrie auf diese Substanzen, wenn nicht ihre rechtzeitige Erkennung in den Säften und Melassen einer Zuckerfabrik es unter Umständen möglich machen könnte, sich die manchmal recht beträchtlichen Verluste an Saccharose zu ersparen.

Zusammenfassung.

1. In Übereinstimmung mit den früher erhobenen Befunden konnte nachgewiesen werden, daß die Bakterien des sog. „Froschlaichs“, die in einer italienischen Zuckerfabrik erhalten wurden, aus 3 Mikrobentypen bestehen, welche mittels einer einschlägigen Technik isoliert, beschrieben und identifiziert werden.

2. Die mit Leuconostoc mesenterioides identifizierten schleimbildenden Streptokokken bewirkten die Umwandlung der Saccharose in eine Schleimmasse vom chemischen Verhalten des Dextrans.

3. Die aeroben sporogenen Bazillen werden mit Bac. vulgatus (Flügge) Migula identifiziert, welcher Art auch die wichtigsten Schleimbildner zugeschrieben werden, die vorher als besondere Arten und Gattungen angesehen wurden. Der von Bac. vulgatus erzeugte Schleim hat die Eigenschaften des Lävulans gezeigt; dieses Polysaccharid hat eine von der des Inulins zweifellos verschiedene Molekularstruktur, denn es wird von dem für dieses letztere spezifische Enzym nicht hydrolysiert.

4. Die Hefe wurde mit Saccharomyces cartilaginosus Lindner identifiziert und die Feststellung ihrer Anwesenheit im „Froschlaich“ stellt einen weiteren Fall der Assoziation dieser Hefe mit Milchsäurefermenten dar.

5. Es wird über verschiedene Anzeichen berichtet, die das Vorhanden-

sein symbiotischer Beziehungen zwischen den 3 Typen von Mikroben, die in den Schleimen der Zuckerfabriken vorkommen, wahrscheinlich machen.

6. Es folgt eine experimentelle kritische Untersuchung der hauptsächlichsten Theorien über den Mechanismus der Schleimerzeugung durch Leuc. mes. und Bac. vulgatus; es wird vergeblich versucht, durch chemische, physikalische, physiko-chemische und biologische Veränderungen der Nährlösungen jene Bedingungen herzustellen, welche in der Natur den Milchsäurestreptokokken das Schleimbildungsvermögen wiedergeben, das diese in künstlichen Kulturen rasch verlieren.

Literaturverzeichnis.

1. Lippmann, E. O. von, Die Chemie der Zuckerarten. Bd. 1. Braunschweig 1904. S. 423. — 2. Liesemberg, C., und Zopf, W. Beitrage zur Physiologie und Morphologie niederer Organismen. Leipzig 1892. Heft 1, S. 1 und Heft 2, S. 1. — 3. Maassen, A., Über Gallertbildungen in den Säften der Zuckerfabrikation. (Arb. Kais. Ges. Bd. 5. 1905. Heft 1.) — 4. Orla-Jensen, S., The lactic acid bacteria. (Mém. de Acad. Roy. d. Sci. et d. Lettres d. Danemark, Copenhague, Sect. d. Sci.· 8me Sér. Vol. 5. 1919. No. 2.) — 5. Jubert, P., Sucr. Indig. Vol. 9. 1874/75. p. 174, 199. V. Lafar, Vol. 2. p. 456. — 6. Teixeire, I. F. Mendes, Journ. des fabr. de sucre. T. 13. 1872. V. Lafar, Bd. 2. S. 456. — 7. Cienkowski, L., Die Gallertbildungen des Zuckerrubensaftes. Charkow 1878 (Russ.). (Scheiblers Neue Ztschr. Bd. 1. 1878. S. 365.) — 8. Tieghem, Ph. van, Ann. d. Sci. nat. Bot. 6e Ser. T. 7. 1878. p. 180. — 9. Schöne, A., Ver. Ztschr. Bd. 51. 1901. S. 453; Bd. 54. 1904. S. 1060. — 10. Zettnow, E., Ztschr. f. Hyg. Bd. 57. 1907. S. 154. — 11. Gonnermann, M., Dtsch. Zuckerind. Bd. 30. 1905. S. 145, 185. — 12. Hucker, G. J., and Pederson, C. S., N. Y. Agr. Exp. Sta. Techn. Bull. Vol. 167. 1930; Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 85. 1931. S. 65. — 13. Wenzel, J., Ztschr. f. d. Zuckerind. d. Cechoslovakischen Rep. Bd. 51. 1927. S. 161, 173. — 14. Saccardo, P. A., Sylloge fungorum. Vol. 8. 1889. p. 924. — 15. Beijerinck, M. W., Folia microb. Vol. 1. 1912. p. 377; Verzam. Geschr. Vol. 5. 1922. p. 89. — 16. Barendrecht, H. P., Die Agglutination von Hefe. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. S. 623.) — 17. Nadson, G. A., und Batschinskaja, A. A. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30. 1911. S. 613. — 18. Knudsen, Soncke, Sonderabdr. a. Den Kgl. Veterinaer og Landbohojskole Aarsskr. 1924. p. 133—186. Ref. in Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 66. 1925. S. 82.— 19. Pederson, C. S., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 80. 1930. S. 42. — 20. Pederson, C. S., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 85. 1932. S. 213. — 21. Smit, J., on Kooymans, L. H. Louwe, Ned. Tydschr. Hyg. Microb. Ser. Bd. 5. 1931. S. 215. Ref. in Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 488. — 22. Smit, J., Folia Mikrobiologica. Vol. 5. 1917. p. 41. Ref. in Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 51. 1920. S. 384. — 23. Oerskow, J., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.). Bd. 119. 1930. S. 88. — Oerskow, J. und Poulsen, K. A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.). Bd. 120. 1931. S. 125. — 24. Koch, F. E., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.). Bd. 130. 1933. S. 381. — 25. Hlava, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.). Bd. 32. 1902. S. 263. — 26. Boeckhout, F. W. J., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900. S. 161. — 27. Orla-Jensen, S., O. c. 4. p. 126. — 28. Beijerinck, M. W., Arch. Neerland. d. Sci. Exactes et Naturelles. Ser. II. T. 13. 1907. p. 357. Verz. Geschr. Vol. 4. 1922. p. 285. — 29. Pederson, C. S., and Breed, R. S., Journ. of Bact. Vol. 16. 1928. p. 163. — 30. Hammer, B. W., Agr. Exp. Sta. Iowa St. Coll. of Agr. Research Bull. Vol. 65. 1920. — 31. Koch, A., e Rosaens, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1894. S. 225. — 32. Glaser, F., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 1. 1895. S. 879. — 33. Poupé, Fr., Böhm. Ztschr. Bd. 22. 1897/98. S. 341. Ref. in Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. S. 484. — 34. Laxa, O., Böhm. Ztschr. Bd. 22. 1897/98. S. 376. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1892. S. 362. Bohm. Ztschr. Bd. 24. 1899/1900. S. 423. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900. S. 286. Böhm. Ztschr. Bd. 26. 1901. S. 122. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. S. 154. — 35. Kramer, E., Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wiss. in Wien, math.-phys. Kl. Bd. 98. 1886. S. 358. Monatsh. f. Chem. Bd. 10. 1889. S. 467. — 36. Gonnermann, M., Dtsch. Zuckerind. Bd. 36. 1907. S. 877. Ref. in Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. 1908. S. 258. — 37. Greig Smith, R., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. S. 596. — 38. Fernbach, A., et Schoen, M., Compt. Rend. d. Acad. d. Sci. T. 155.

1912. p. 84. — 39. Beijerinck, M. W., Ztschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide. Bd. 7. 1910. S. 16; Verz. Geschr. Vol. 4. 1922. p. 341. — 40. Beijerinck, M. W., Arch. Neerland. d. Sci. Exactes et Nat. T. 29. 1896. p. 1; Verz. Geschr. Vol. 3. 1922. p. 68. — 41. Vogel, J., Ztschr. f. Hyg. Bd. 26. 1897. S. 398. — 42. Seiler, Fr., Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 9. 1905. S. 513. — 43. van der Bijl, P., Int. Sugar Journ. Vol. 23. 1921. p. 320. — 44. Rossi, G. de, Microbiol. agrar. e tecnica. Torino 1927. — 45. Lafar, F., Handb. d. Techn. Mikologie. Bd. 2. Jena 1805—08. — 46. Fuhrmann, F., Einf. in d. Grundl. d. Techn. Mikologie. Jena 1926. — 47. Sacchetti, M., Boll. Ind. Sacc. Ital. Ann. 27. 1934. p. 49. — 48 Velich, A., Bohm. Ztschr. Bd. 27. 1903. S. 475. — 49. Owen, Wm. L., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 40. 1914. S. 244. — 50. Lehmann, K. B. und Neumann, R. O., Bakteriologische Diagnostik. Munchen 1920. 6. Aufl. — 51. Pribram, E., Klassifikation der Schizomyceten. Leipzig u. Wien 1933. — 52. Bredemann, G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 385. — 53. Lafar, F., Handb. d. Techn. Mykologie. Vol. 2. 1905—08. p. 120. — 54. Nestler, Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 10. V. De Rossi, O. c., p. 254. — 55. Artari, A., Abh. d. Naturf. Ges. zu Halle. Bd. 21. 1897, da Owen (56). — 56. Owen, W. L., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. 1913. S. 468. — 57. Kossowicz, A., Ztschr. f. d. Landwirtschaftl. Versuchswes. in Österr. Bd. 14. 1911. S. 20. Ref. in Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30. 1911. S. 273. — 58. Stelling-Decker, N. M., Die sporogenen Hefen. Koninkl. Akad. v. Wetenschappen te Amsterdam 1931. — 59. Sacchetti, M., Arch. f. Microb. Bd. 3. 1932. S. 650. — 60. Schoenfeld, F. und Rommel, W., Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 26. 1909. S. 327. — 61. Korolev, S. A., Ossnovy tiechniciesskoi mikrobiologhii molocnovo diela, Mosca e Leningrado 1932. p. 103. — 62. Karaffa-Korbutt, K. V., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 40. 1914. S. 239. — 63. Scheibler, C., Ver. Ztschr. Bd. 19. 1869. S. 472; 24. Bd. 1874. S. 309. — 64. Kagan, B., Journ. d. Microb. d. Acad. d. Sci. Ukraine. 1934. p. 75. V. Ann. d. ferm. T. 1. 1935. p. 374. — 65. Nepomniashchaia, M. L., Journ. d. Microb. d. Acad. d. Sci. Ukraine. 1934. p. 55. V. Ann. d. ferm. T. 1. 1935. p. 375. — 66. Wohryzek, O., Chemie d. Zuckerind. Berlin 1928. 2. Aufl.

Nachdruck verboten.

Stinkende fadenziehende Milch.

Von **Otakar Laxa**, Prag.

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Erscheinung der fadenziehenden Milch, welche in den kälteren Ländern häufig vorkommt, wurde durch zahlreiche Arbeiten erforscht und die Erreger beschrieben[1]). Dazu will ich einen Beitrag liefern aus dem Grunde, weil es sich um einen ganz speziellen Fehler handelt, durch welchen nicht nur die Konsistenz, sondern auch der Geruch der Milch beeinträchtigt wurde.

Von einem Großgrundbesitz bei Prag hat man mir ein Milchmuster gesendet, um die Ursache des Schleimigwerdens erforschen zu lassen. Da ein solcher Fehler in der Tschechoslowakei überhaupt sehr selten vorkommt, glaubte ich, es handle sich um das gewöhnliche scheinbare Schleimigwerden des Rahmes, das sich in der kälteren Saison hier und da infolge des Auftretens der schleimbildenden Abarten der Milchsäurebakterien zeigt. Aber dies war nicht der Fall. Beim Umgießen ist die ganze Milch aus der Flasche wie Quecksilber herausgefallen und man konnte mit einem spitzen Gegenstand lange Fäden aus der Milch ziehen. Die Milch zeigte 10 Säuregrade nach Soxhlet-Henkel. Der Besitzer klagte, daß die Milch sehr schlecht säuert und später einen üblen Geruch bekommt. Als ich die Milch im Glas-

[1]) Die Literatur siehe am Schluß der Arbeit.

zylinder bis zum anderen Tage stehen ließ, schied sie den Rahm als eine Schaumschicht von der flüssigen Milch ab und roch nach Hefe, später bekam sie trimethylaminartigen Geruch.

Die Molkengelatineplatten lieferten zahlreiche Kolonien von schleimiger Beschaffenheit, nebst Kolonien der Milchsäurebakterien, die in beschränkter Anzahl vertreten waren.

Durch die mikroskopische Untersuchung wurde festgestellt, daß es sich um ein Bakterium von 1,5 μ Länge und 1 μ Breite handelt, das schöne Kapseln bildet, die nach John sich sehr gut färben lassen. Dann messen die Bakterien 4 μ in der Länge und 3 μ in der Breite. Die Bakterienzellen sind einzeln oder gepaart, auch in Tetraden, doch niemals in Ketten. Das Bakterium ist unbeweglich und färbt sich nicht nach Gram. Der Mikrob, den ich Viscobacterium lactis foetidum nenne, wächst sehr gut in den verschiedenen Nährsubstraten, wobei es in zuckerhaltigen Böden zur Schleimbildung kommt.

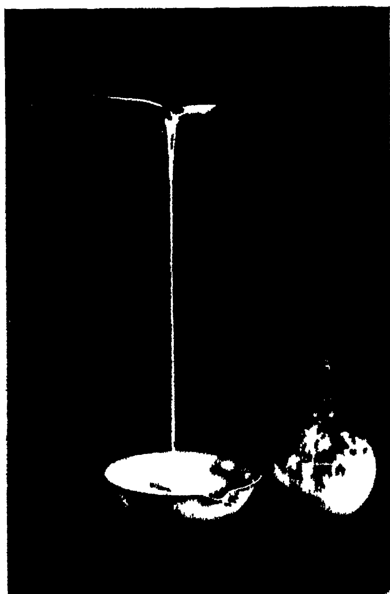


Abb. 1.

Auf der Molkengelatine erscheinen in einigen Tagen weiße, rundliche, aufgewölbte Kolonien bis ½ cm im Durchmesser mit glatten Rändern, deren Schleim zusammenhaftet, so daß man ihn vom Substrate schwer abtrennen kann. Auf Fleischpeptongelatine wachsen kreisrunde Kolonien mit glattem Rande, von bräunlicher Farbe; sie sind zwar schleimig, aber nicht fadenziehend. Die Gelatine wird nicht verflüssigt. Auf Schrägagar entsteht ein dünner, schleimiger, hellbräunlicher Belag, der herabfließt und stark fadenziehend ist. Molkengelatine-Stichkultur zeigt knopfähnliches Wachstum auf der Oberfläche mit üppiger Entwicklung im Stichkanal, wo sich später Gasblasen bilden. Die Gelatine bleibt fest. In Fleischbouillon entsteht Trübung und schwacher Schaum an der Oberfläche. In Molke erscheint auch Trübung und Schleimbildung ohne Gasblasen. In Bierwürze sehen wir in wenigen Tagen Schaum- und Schleimbildung, auch Trübung. Die Entwicklung in Zuckerrübensaft ist sehr langsam und es bildet sich wenig Schleim. Auf Kartoffel entsteht ein schleimiger, bräunlich-weißer Belag, die Kartoffel bekommt dunkle Färbung und es entwickelt sich ein starker Geruch nach Trimethylamin; die Kultur ist nicht fadenziehend.

Die Milch ändert das Aussehen in den ersten Tagen nicht. Doch schon am 2. Tage wird sie bei Zimmertemperatur fadenziehend (siehe Abbildung), später erscheinen an der Oberfläche spärliche Gasblasen und zugleich riecht die Milch nach Hefe und faulen Rübenblättern. Nach Ablauf 1 Monats scheidet sich das Kasein allmählich als schleimiger, voluminöser Bodensatz ab. Beim Erwärmen zur Siedetemperatur zieht sich das Kasein zusammen und bekommt knorpelige Beschaffenheit, die Molke ist fadenziehend und riecht unangenehm nach Trimethylamin.

Das Bakterium gedeiht am besten bei 17—25° C, wobei die Milch in 24 Std. fadenziehend wird, bei 7° C macht es die Milch in 3 Tagen fadenziehend. Bei 37° C wächst der Mikrob nicht mehr, ebenso wie bei 3° C. Da das Bakterium keine Sporen bildet, geht es durch Kochen und Pasteurisieren leicht zugrunde. Es verträgt eine 5 Min. lange Erwärmung auf 63° C, nicht aber eine 10 Min. lange. Bei einer Temperatur von 75° C in 30 Sek. wird es vernichtet.

Viscobacterium lactis foetidum wächst bei Luftzutritt wie unter Luftabschluß. Die Stichkultur mit hoher Schicht von Gelatine oder Agar bedeckt, entwickelt sich innerhalb des ganzen Stichkanals und es entstehen Gasblasen. Demzufolge muß man das Bakterium unter die fakultativen Anaerobionten einreihen.

Das Säuerungsvermögen des Bakteriums ist ziemlich schwach. Nach 4 Monaten zeigt die Milch nur 8,6° Soxhlet-Henkel, nach noch längerer Aufbewahrung nur 9,3° S.-H. Nach 2 Monaten sind nur 0,04% flüchtige Säuren gebildet und von nichtflüchtigen, wahrscheinlich Milchsäure, noch weniger. Aus dem Umstande, daß der Säuregrad von 9,3° nicht genügt, die Milch in der Kälte gerinnen zu lassen, wozu bekanntlich mindestens 20° S.-H. nötig sind und daß in den alten Kulturen doch das Kasein ausgeschieden ist, kann man schließen, daß das Bakterium ein schwaches Labferment bilden wird.

Das Bakterium verträgt nur schwache Azidität. In den flüssigen, künstlichen Nährböden ohne Eiweiß (2% Asparagin, 4% Milchzucker, 0,6% Milchasche) wächst es noch bei 12° (S.-H.) unter Zusatz von Milchsäure, nicht aber bei 20° S.-H.

Das Milchfett ändert sich durch die vitale Tätigkeit des Bakteriums fast nicht. Nach 2 Monaten betrug der Säuregrad des Milchfettes nur 3,5°, fast ebensoviel wie das Fett aus der Kontrollprobe zeigte. Auch das Kasein unterliegt der Zersetzung sehr wenig. Eine 2 Monate alte Milchkultur enthielt:

Kasein und Albumin	4,19%
Albumosen und Peptone	0,34%
Aminosäuren	0,01%
Ammoniak und Amine	0,01%

Man sieht daraus, daß das Peptonisationsvermögen des Bakteriums sehr gering ist.

Am meisten leidet der Milchzucker. In der 2 Monate alten Milchkultur konnte man nur durchschnittlich 0,3—0,5% reduzierenden Zucker feststellen. Da aber in der Milch rund 4,5% Milchzucker enthalten sind, ist also ca. 90% des ursprünglichen Milchzuckers verschwunden. Bei der Zersetzung des Milchzuckers bildet sich Kohlensäure, was mittels Barytwasser leicht nachgewiesen werden kann, und zwar in der 1. Woche am meisten. Man kann das an den Gasblasen beobachten, welche sich an der Milchoberfläche nur in den ersten 5 Tagen entwickeln. Nach einem wiederholten Versuche, wobei die Kohlensäuremenge auf den Milchzucker berechnet wurde, wurde gefunden: nach 8 Tagen 10%, nach weiteren 7 Tagen nur 3%.

Bei dieser Gärung bildet sich auch etwas Alkohol, wahrscheinlich Äthylalkohol. Aus 200 ccm der Milchkultur konnte man Alkohol abdestillieren. Die ersten Tropfen riechen nach Äthylalkohol. Daß es sich uberhaupt um Alkohol handelt, geht aus dem Umstande hervor, daß die ersten Tropfen des Destillates eine so starke Jodoformreaktion geben, daß die Flüssigkeit gelb getrubt ist. Die quantitative Bestimmung hat gezeigt, daß es sich im ganzen um wenige Zehntel Prozente handelt. Die Erscheinung der Gärung, die von sichtbarer Kohlensäurebildung begleitet wird, findet sich nicht in allen Substraten mit Milchzuckergehalt, sondern nur bei Gegenwart bestimmter

Substanzen. Die sichtbaren Gasblasen erzeugt der Mikrob in der Milch, die Schaumbildung kann man in den künstlichen Nährboden mit Milchzucker und Pepton, Milchzucker und Albumin, oder Kreatin sehen, die Gasbildung in den milchzuckerhaltigen Substraten tritt erst nach längerer Zeit bei Gegenwart von Harnstoff auf und überhaupt nicht bei Zusatz von Kasein, Asparagin, Glykokoll und Leuzin. Das Bakterium bildet aus Milchzucker auch eine geringe Menge von Säure, worüber oben schon gesprochen wurde.

Die Trockensubstanz der Molke der Milchkultur machte nach einmonatiger Aufbewahrung nur 2,3—2,6% aus, obwohl man in der gewöhnlichen Molke 6,5% findet. An dieser verminderten Trockensubstanz partizipierte Zucker mit 0,5%, Asche 0,5, stickstoffhaltige Substanzen mit 0,5, zusammen 1,5%. Daraus folgt, daß rund 1% einer unbekannten Substanz entstehen muß, höchstwahrscheinlich Schleim. Diese Vermutung wurde durch die direkte Bestimmung des Schleimes bestätigt. Eine 1 Monate alte Milchkultur lieferte nach ½stünd. Erwärmung im Dampftopfe fast klare Molke. Ein abgemessener Teil der Flüssigkeit wurde mit dem zehnfachen Volumen 96% Alkohols gemischt, wobei ein weißer, fetzenartiger Niederschlag entstand, der nach Abzug der Asche und der stickstoffhaltigen Substanzen 1% ausmachte.

Um die Natur dieser Substanz zu erkennen, zuchtete ich den Mikroorganismus in verschiedenen flüssigen Substraten. Die Grundlösung enthielt in 1 l Wasser 6 g Milchasche und 0,5 g Zitronensäure. Dieser Flussigkeit wurden die stickstoffhaltigen Substanzen zugesetzt, nämlich (2%) Kasein oder Natrium-Kasein oder Pepton oder Asparagin. Alle diese Lösungen wurden durch das Bakterium stark schleimig, nicht aber fadenziehend. Demnach benötigt das Bakterium zum Schleimigwerden keine Kohlehydrate. Es genügen ihm Eiweißstoffe oder Amine. Auch Aminosäuren dienen diesem Zwecke, beispielsweise Glykokoll, Leuzin. Ammoniumnitrat bewährte sich nicht als Stickstoffquelle. Die Lösungen mit diesem Salz sind ohne sichtbares Wachstum geblieben.

Zur Erscheinung der fadenziehenden Beschaffenheit der Flüssigkeiten sind aber die Zuckerarten notwendig. Die Grundnährlösung (siehe oben) unter Zugabe von 2% Natriumkasein und 4% Zucker war immer schon am 3. Tage stark fadenziehend. Ich prüfte Glukose, Fruktose, Galaktose, Saccharose und Maltose. Alle diese Zuckerarten haben dieselben Resultate ergeben wie Laktose. Es ist zu sehen, daß an dem Aufbau des Schleimes nicht nur Eiweißstoffe, sondern auch die Kohlehydrate teilnehmen, daß es sich nicht um ein Zersetzungsprodukt, sondern um einen mit dem Bau der Mikrobenzelle verbundenen Stoff handelt.

Um die Natur des Schleimes in der Milch kennenzulernen, züchtete ich das Bakterium in steriler Magermilch in größerem Maßstabe. Eine 2 bis 3 Monate alte Kultur wurde im Sterilisator der Wirkung des strömenden Dampfes ausgesetzt, wobei sich fast klare Molke von knorpelig niedergeschlagenen Eiweißstoffen ausschied. Die fadenziehende Molke wurde durch Alkoholüberschuß gefällt, der Niederschlag mit Alkohol gewaschen. Die erhaltene Substanz löst sich nicht in Wasser, sondern zieht sich als grobkörnige, weiße, weiche Masse zusammen. Sie wurde getrocknet und pulverisiert. Die chemische Untersuchung ergab:

Feuchtigkeit	5,17%
Fett	0,77%
Eiweißstoffe	39,20%
Kohlehydrate (aus Differenz)	25,01%
Asche	29,85%

Aus der Analyse ist ersichtlich, daß es sich um ein Gemenge von Eiweißstoffen, Asche und Kohlehydrate handelt. Die Asche besteht fast ausschließlich aus Kalziumphosphat. Eine kleine Menge freier Säuren in der Kultur genügt nämlich, um das Kalziumphosphat der Milch zu lösen und durch den Alkoholzusatz wurde es in den Niederschlag übergeführt. Die Kohlehydrate des Schleimes basieren auf der Glukose und Galaktose des Milchzuckers, da das Bakterium diese beiden Zuckerarten in Schleim zu überführen fähig ist. Man kann im gereinigten Schleim die Galaktane nachweisen. Durch die Oxydation mittels Salpetersäure bekommt man Schleimsäure, die nur in Galaktose ihren Ursprung haben kann.

Das Bakterium hat keine diastatische Wirkung, der Stärkekleister in künstlichen, flüssigen Nährböden (Milchasche, Asparagin, Milchzucker) ändert sich durch seine vitale Tätigkeit nicht.

Aus obiger Beschreibung der Eigenschaften geht hervor, daß der Mikrob keine Lipase, keine Diastase und nur ein schwaches Labferment und eine schwache Kasease enthält. Die Charakteristik dieses Bakteriums wäre unvollkommen, wenn wir nicht andere Enzyme in Betracht zögen. Die Reduktase kann man in Milchkultur leicht nachweisen. Eine 14tägige Kultur in der Menge von 10 ccm reduziert 10 Tropfen der Schardingerschen Lösung in 10 Min. Sehr reich sind die Kulturen an Katalase. Die Milchkultur des erwähnten Alters, gemischt mit Wasserstoffsuperoxyd (1%) im Verhältnis 15 : 5 ccm, entwickelte in 1 Std. 9,5 ccm Sauerstoff. Um die Anwesenheit der Laktase in der Kultur zu entdecken, benutzte ich die verdünnte Lösung des Milchzuckers (ca. 3%). Ein abgemessener Teil der Lösung (50 ccm) wurde mit 10 ccm der Milchkultur gemischt, mit 5 ccm Xylol geschüttelt und in Ruhe stehen gelassen; nach der Klärung (2 ccm 10% Quecksilbernitrat) und Filtration wurde die Lösung polarisiert. Der ursprüngliche Wert (10,3°) (Wentzke) änderte sich in 4 Std. nicht, aber auch nicht nach 20 Std. Die Bakterienzellen bilden also kein Exo-Enzym, wie es die Laktase darstellt.

Der Ursprung des unangenehmen Geruchs, der dem Trimethylamin ähnelt, erschien als ein Problem für sich. Die künstlichen Substrate, die aus Wasser und reinen Substanzen (Milchasche mit Zusatz von Kasein oder Asparagin und Milchzucker) bestanden, die durch die Tätigkeit des Bakteriums verändert wurden, waren auch nach längerer Zeit ganz geruchlos. Es lag der Gedanke nahe, daß die Phosphatide der Milch, in welchen die Trimethylamin-Gruppe des Neurins sich befindet, die Erscheinung verursachen. Aber ein Zusatz von Phosphatiden aus Eidotter oder aus der Milchdrüse zu Asparagin-, Milchasche- und Milchzucker-haltigen Böden hatte nach dem Impfen keinen Trimethylamin-Geruch zur Folge. Auch Harnstoff-, Harnsäure-, Kreatin-Zusatz war ohne Wirkung. Der Umstand, daß ein ähnlicher Geruch in Kartoffelkultur entsteht, führte mich zu dem Versuche mit Solanin, was aber wieder von einem Mißerfolg begleitet war. Betain, Glukosamin sind auch ohne Wirkung geblieben.

Zufälligerweise kultivierte ich auch das Bakterium in Sojamilch und es zeigte sich ein Unterschied in der Kultur ohne und mit Milchzuckerzusatz. In beiden Fällen wuchs das Bakterium üppiger als in der Kuhmilch, was aus der reichlicheren Gasbildung und stärkeren fadenziehenden Beschaffenheit der Flüssigkeit zu ersehen war. Während in der Kultur aus reiner Sojamilch die Flüssigkeit homogen war und neben dem Hefegeruch ein bei Zerteilung zwischen den Fingern deutlich werdender Trimethylamin-Geruch

auftrat, wurde in der Kultur mit Milchzuckerzusatz ein Koagulum von wasserklaren Molken ausgeschieden und man konnte keinen Geruch bemerken. Es bleibt unaufgeklärt, welche Bestandteile der reinen Sojamilch man als Quelle des Geruches bezeichnen soll; daß es die Eiweißstoffe sind, kann man mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit annehmen.

Ebenso bleibt die Frage der Infektionsquelle ungelöst. Die Futtermittel und das Wasser wurden in dieser Hinsicht nicht geprüft. Nach Mitteilung des Besitzers stand der Fehler in Zusammenhang mit schlecht eingelegten Zuckerrübenschnitzeln und er verschwand, als die Grube ausgeschöpft war. Das Impfen der Grube mit Milchsäurebakterien hatte eine Schwächung des Fehlers zur Folge. Aus dem seltenen Vorkommen des Fehlers geht hervor, daß das Bakterium zu solchen Mikroben gehört, welche in der Natur nicht stark verbreitet sind. Die Infektionsfähigkeit des Mikroben ist ziemlich groß, da die geimpfte rohe Milch bei Zimmertemperatur geradeso fadenziehend wird wie die sterile Milch. Dabei entwickeln sich in roher Milch auch die Milchsäurebakterien, die Milch wird sauer und gerinnt. Die Milchsäurebakterien verhindern also nicht die Entwicklung des fadenziehenden Bakteriums.

Zusammenfassung.

Aus übelriechender, fadenziehender Milch konnte ein Bakterium isoliert werden, das als die Ursache dieses Milchfehlers erkannt wurde. Es wird Viscobacterium lactis foetidum benannt und seine Eigenschaften werden beschrieben.

Literatur.

Pasteur, Compt. rend. T. 45. 1857. p. 915. — Schmidt-Mühlheim, Arch. d. Physiol. Bd. 27. S. 490; Milchzeitung. 1882. S. 602. — Duclaux, Annales agronom. 1883. — Hueppe, Mitt. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 2. 1884. S. 366. — Loeffler, Berliner Klin. Wochenschr. 1887. S. 631. — Adametz, Milchzeitung. Bd. 18. 1889. S. 941; Landw. Jahrb. Bd. 20. 1891. S. 185. — Beijerinck, Botan. Ztschr. Bd. 49. 1891. S. 704. — Wittmack, Molkerei-Ztg. Hildesheim. Bd. 6. 1892. S. 593. — Guillebeau, Milchzeitung. 1892. S. 294. — Goethart, Kochs Jahresber. 1897. S. 194. — Weigmann, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. S. 605. — Troili-Peterson, G., Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 32.; Milchzeitung Bd. 28. 1899. S. 438. — Leberke, Dissert. phil. Leipzig (noch nicht veröffentlicht), zit. nach Löhnis. — Emmerling, Berl. Berichte. Bd. 33. 1900. S. 2478. — Guillebeau, Landw. Jahrb. d. Schweiz. Bd. 5. 1901. S. 135. — Ward, Cornell University Agricultural Experiment Station Buletin. 1901. p. 195. — Burri, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. S. 135. 1901. — Hohl, Schweizer Landw. Jahrb. 1902. S. 342. — Schardinger, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. S. 144. — Peter, Berl. Molkerei-Ztg. Bd. 13. 1903. S. 194. — Gruber, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. S. 785. — Burri, Ebenda. Bd. 12. 1904. S. 379. — Rothmann, Ebenda. Abt. I. Bd. 37. 1904. S. 491. — Hohl, Landw. Jahrb. d. Schweiz. Bd. 20. 1906. S. 437. — Burri, Molkereitechn. Rundschau. Nr. 10/11. Beil. z. Schweiz. Milchztg. 1908. — Burri-Thöni, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 32; Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1909. — Burri-Allemann, Ztschr. f. Unters. d. Nahrungsmittel. Bd. 16. 1909. S. 449. — Thöni-Thaysen, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 36. 1913. S. 359. — Magnusson, Ebenda. Bd. 48. 1918. S. 459. — Emrich, Diss. Techn. Hochschule. München 1932. — Kelly, N. Y. State Agr. Exp. Stat. Bul. Vol. 63. 1933.

Nachdruck verboten.

Clostridium (Bacillus) tetrylium n. sp., a new Species of the Acetobutylicum group.

By

Wm. L. Owen,
Consulting Bacteriologist, Baton Rouge, Louisiana

Roy L. Mobley,
Assistant Bacteriologist, Baton Rouge, Louisiana

and **Rafael Arroyo,**
Chief Chemist, Agricultural Experiment Station, Rio Piedras, Puerto Rica.

In the fall of 1931 Arroyo isolated, from the lower nodes of the Kassoer variety of sugar cane in Puerto Rica, a species of bacteria which manifested unusual zymogenic properties in the fermentation of molasses mashes. A culture was sent to the laboratory of the Senior author (Owen) where it has been under constant observation and study.

The species in question is of unusual interest on account of its very specific habitat and its biochemical characteristics.

Source of the Organism.

In the course of an extended investigation of the bacterial flora of the soil surrounding the roots of sugar cane varieties in Puerto Rica, Arroyo discovered some very active strains of butyl organisms. The most promising strains from the standpoint of industrial utilization we obtained from the following varieties of cane; viz., P. O. J. 2725, 2883, 2873, 979 and 1228; F. C. 588, 916 and 998; and P. R. 820 and 807. Finally when the flora of the root zones of the Kassoer variety was investigated, a species was discovered which was incomparably more vigorous from a zymogenic standpoint than any that had been previously isolated. It was of significance also that this strain could invariably be obtained from this source, while it could only rarely be found else-where, although many samples of soils from other cane varieties have been examined and investigated.

The isolations were made as follows.

A set of twelve test tubes, each containing ten ml. of sterile mash, consisting of a Puerto Rican Black Strap molasses diluted to a 4 brix were inoculated with platinum loops from the soil around the roots of the cane. The tubes were then immersed in boiling water for 50 seconds and immediately cooled in running water and incubated for 36 hours. They were then examined for odor and gas production. The tubes showing the most vigorous fermentation and strongest butyl odor were chosen and further incubated until the fermentation was completed; reheated in boiling water; cooled and the contents plated in Malt-Gelatin-Agar. After inoculation the plates were poured using the inverted method of Marino (1). Transfers were made from the colonies that developed, to sterile molasses mash, and the most active strains selected for further work. After much experimental work the following formula for the standard mash of medium was elaborated, the preparation of which is as follows.

Wort or Medium.

Weigh 90 grams of molasse into a 2 l. Erlenmeyer flask, add 400 cc. of water and dissolve the molasses on the water bath with occasional stirring. When solution is effected 1.5 cc. of concentrated sulphuric acid, specific gravity 1.84, is added and the contents of the flask is autoclaved 30 minutes at 20 pounds pressure to invert the sucrose. After cooling to approximately 50 degrees centigrade 5.5 grams of calcium carbonate is added. After effervescense has subsided 1.5 cc. of ammonium hydroxide are added to the flask and the volume is completed to 1800 cc. with distilled water. The container is then plugged with non-absorbent cotton and again autoclaved for 30 minutes at 20 pounds pressure. When thus prepared the standard mash gives a reading of pH 6.0 but if it is found more acid the reaction is adjusted to this pH by the further addition of calcium carbonate.

Pure Culture Methods.

The isolations from the plate method used were further purified by the Barber pipette technique (2), the modified micro-manipulator (3) and special plate procedure (4).

Description of the Organism.

Clostridium (Bacillus) tetrylium n. sp. Rods, measuring $1.5 \times 5.0—6.0\ \mu$, occurring singly and in chains, ends rounded, actively motile by means of peritrichous flagella, spores oval and terminal, cells swollen at sporulation, granulation is evident in 48 hour cultures, organism requires a saccharine material for growth and the cells stain fairly easy with most stains. It is Gram-positive.

Gelatine stab: No growth. With dextrose there is no liquefaction in 8 days, with good growth at the bottom and the medium is blown with gas.

Malt-Gelatin-Agar Colonies: Growth fair, edges lobate, elevation is raised, appearance, dull, surface smooth, optically opaque, has a solvent odor, consistency is buttery and the medium is unchanged.

Agar Stab: Media blown so that the characters are destroyed and the growth is fair.

Glucose Broth: Slightly cloudy, Solvent odor, and moderate and compact sediment.

Potato: (On old Potatoes only) Growth fair, Form of growth is spreading, elevation is flat, optically dull to glistening, surface smooth, ethereal odor, and no chromogenesis.

Litmus Milk: Acid reaction, acid curd, slight peptonization and some reduction of litmus.

Andrade-Dextrose-Brain-Broth: Acid reaction, gas produced and brain not blackened.

Tryptophane Broth: Indole not formed in 8 days.

Lead-Acetate-Agar: Hydrogen sulphide not formed.

Dextrose-Peptone-Broth: Acetyl methyl carbinol not produced.

Nitrate Broth: Nitrates not reduced. Gas not formed.

Fermentation.

1. With acid, without gas; Mannitol.
2. With gas, without acid; Dulcitol.
3. With acid and gas; Glucose, lactose, maltose, 1-arabinose, 1-xylose, inulin, fructose and cereal mash.
4. Does not ferment; Mannose, glycerol, dextrin, salicin, starch, raffi-

nose, galactose, inositol, rhamnose, melezitose, glycogen, sorbitol and erythritol.

Chromogenesis: None.

Pathogenicity: Non-pathogenic.

Optimum Temperature: 34 degrees centigrade.

Optimum pH: 6.00.

Relation to Oxygen: Anaerobic.

Habitat: Soil. Isolated from Kassoer variety cane nodules in Puerto Rica.

Similar or Closely Related Organisms.

Since the development of the industrial process for the production of solvents from starch and amylaceous materials by fermentation has become an outstanding biochemical achievement a number of organisms have been isolated and utilized for this purpose.

In order to show the specificity of tetryl and its differentiating characters as compared to the others listed in the Patent literature, we have elaborated the following groupings of the various organisms into their respective classes.

1. Organisms utilizing starch as a source of fermentable carbohydrates (5).

a) Bacillus butylicus Fitz.

b) Granulobacter saccharobutylicum Beijerinck.

c) Motile Buttersäure-Bacillus Grassberger and Schattenfroh (Clostridium butyricum Prazmowski).

d) Clostridium pastorianum Winogradsky.

e) Clostridium americanum Pringsheim.

f) Bacillus amylobacter Bredemann.

2. Organisms capable of fermenting sucrose without a prior inversion.

a) Clostridium saccharo-butylicum beta (6).

b) Clostridium saccharo-butylicum gamma (7).

c) Clostridium saccharo-aceto-butylicum (8).

3. Organisms incapable of fermenting sucrose prior to inversion.

a) Clostridium propyl-butylicum (9).

b) Clostridium viscifaciens (10).

c) Clostridium (Bacillus) tetrylium (11).

4. Solvents produced by the different organisms. Organisms being subdivided as to the solvents and the percentages each produce.

Organism	Solvents			
	% Butanol	% isopropanol	% Acetone	% Ethanol
Clos. propyl-butylicum . .	65—70	16—20	5—10	3—4
Clos. viscifaciens	66.00	31.00	3.00	0.00
Clos. (B.) tetrylium	74.50	0.00	20.50	5.00

From this classification, as to the different characters, it can be seen that tetryl is easily distinguished from the other members of its group in that it forms no isopropanol and its ratio of other solvents is quite different from that formed by the other species of its own class.

None of the species included in groups two and three have been given specific incorporation in Bergey's (12) Manual under the Genus Clostridium butyricus Prazmowski and it is greatly desired that they eventually find their respective places in that authorative treatise.

Summary.

1. A new organism is described. It has been designated as Clostridium tetrylium n. sp.
2. Methods for isolating and cultivating this organism are given.
3. The comparative physiological properties are given as to their industrial interest, e. i. their solvents production.

Citations.

1. Marino, F., Ann. de l'Inst. Past. Vol. 21. p. 1005. — 2. Barber, M. A., Philipine J. Sci. B. 9. 1914. p. 307—360. — 3. Hecker, F., J. Inf. Dis. Vol. 19. 1916. p. 305. — 4. An unpublished method by the authors. — 5. Smyth and Obold, Industrial Fermentations. Vol. 76. 1930. — 6. Izsak, Alexander, U. S. Patent Reissue. 18,729. 1933. — 7. Izsak, A., and Funk, F. J., U. S. Patent. 1,908. 1933. p. 361. — 8. McCoy, E., British Patent 415,311. 1934. — 9. Muller, John, and Legg, D. A., British Patent 415,312. 1934. — 10. Sherman, J. M., and Erb, N. M., U. S. Patent 2,017,572. 1935. — 11. Arroyo, R., U. S. Pat. Appl'n 715,374, Allowed April. 1934. British Pat. Appl'n 7,871; Allowed Dec., 1935. — 12. Bergey, David H., Manuel of Determinative Bacteriology. 1934. Rev.

Nachdruck verboten.

The Influence of Growth-Promoting Substances upon the Determination of Bacterial Density by the Plating-Method.

[Microbiological Laboratory of the Zuider Zee Reclamation Works.]

By Ir. G. W. Harmsen and Dr. H. J. Verweel.

Mit 7 Abbildungen im Text.

The determination of the bacterial density in the soil is carried out in the Microbiological Laboratory of the Zuider Zee reclamation works principally by the plating method. Although it is realised that the actual number of microbes is not determined by this means, but only a certain fraction there of, viz. only those micro-organisms wich develop on the culture media used when this technique is applied, the plating method cannot be dispensed with, as no better method has yet been discovered. It is true that of late years the direct enumeration of bacteria in stained microscope preparations of a soil suspension has been more and more perfected, yet it is difficult for the present to apply it strictly numerically. As long as the fundamental question whether all the visible bacteria are really viable or to a large extent individuals which have already died off, has not been answered with certainty, the application of direct enumeration as an established method is too risky. Therefore we must make shift with the least objectionable sufficiently tested method, the plating method.

In carrying out the plate enumerations efforts were made to secure the greatest possible reliability and accuracy of the results obtained, for

only in that case can the results be compared with one another and conclusions based upon them. After long methodical experiments the method wich is briefly described below was worked out:

The plates are prepared by the inoculation of 10 cc. of agar medium, which has been melted and afterwards cooled to 38° C., with ½ cc. of a dilute suspension of the soil. This 10 cc. of medium is poured out into Petri dishes of about 10 cm. Ø, so that the thickness of the plate is very slight. The colonies which develop can then be counted easily by means of a binocular, enlarging 8 times against a black background upon which strips corresponding to the width of the field of vision are indicated. When counted with a magnifying glass even the smallest colonies do not escape observation. Incubation takes place at 28—30° C. and lasts 8 days. The soil suspension used for inoculation must be diluted to a degree that approximately the desired number of colonies per plate will develop. It is obtained by successive dilutions from the original dense suspension. When dealing with a soil which is as yet unknown, in which the number of bacteria cannot be estimated even approximately, plates are prepared from two or more dilutions.

Ten parallel plates are poured of each sample of soil (if more than one dilution is used, 10 parallels of each dilution).

The very fact that the counting is carried out in ten-fold ensures a certain degree of accuracy and reliability; moreover all the manipulations were effected as accurately as possible and the taking of samples, the mixing of the samples, the preparation of the suspensions (not shaking but rubbing till all the lumps had disappeared), the measurement of the inoculation quantities (with standardised pipettes), etc. were all effected with the greatest possible care, so that the whole process may be looked upon as very accurate. As a matter of fact the accuracy of each manipulation has been determined and it has been ascertained that the results obtained cannot have been affected more than 2—3% by the errors made. A detailed description of the method of working would take too long and this must be deferred to a later more technical publication, but we should like to stress the point, that the plate countings were carried out with extreme care, so that it was to be expected that no serious errors in the method were made.

However accurate the application of the working-method described above and however reliable therefore the results obtained may be expected to be, it is desirable to submit their accuracy and reliability to a check, because the occurrence of unforeseen systematic errors is a possibility which must always be taken into account.

The possible errors may be divided into two groups — into errors which influence a whole series of 10 parallel plates at the same time — thus yielding a mean which is wrong in principle, and errors which affect the results of the separate plates of a series individually, thus causing an abnormal variance of the 10 parallel counts.

The first category of errors is, of course, very difficult to discover. It is not possible, in any case, to indicate an universally applicable means of doing so. These errors can only be recognised in the long run, quite empirically, by repeating the determination several times with slight variations of the method, or else by comparing the results obtained by the plating method with determinations carried out in the same samples by other means, such as the dilution method in liquid media or the determination of the activity of the bacteria (CO_2-production, ammonification and the like). The carrying out of blank determinations is often useful too. Some uncertainty always remains, however, with regard to the manner of determination, an uncertainty, indeed, which is always present in any scientific or ana-

lytical work. This uncertainty can never be entirely eliminated, and each investigator must determine for himself during the progress of his work whether the method applied by him gives correct results and whether it harbours no systematic errors. Such a complicated and sensitive biological manner of working as the plate-counting method always includes a practically uncontrollable element of uncertainty.

The other errors, which affect the variance of the separate results in a series of parallel determinations, can be found much more easily. At any rate they do not remain entirely hidden, being revealed exactly by the abnormal variance. The bare recognition of an abnormal variance — that is of a variance which deviates from what was expected by reason of the laws of probability — does not mean, of course, that its cause can also be determined at once, but it is in any case the first essential step in the tracing of the errors and the improvement of the technique.

If very long series of parallel determinations are available, it can be examined in each series whether the variance of the separate determinations is in accordance with the laws of probability or not. However in the small series of only ten — or even fewer — parallels, such as are always obtained in micro-biological masswork, this is impossible, as the variance may now be very different from series to series without any errors having been made. It is, however, impracticable to make use of longer series, as this would render the work too slow, too unproductive and too expensive. Large series of parallel determinations in micro-biological work have the further disadvantage that the preparation period becomes very long, so that the plates which are prepared first are likely to be poured in somewhat different circumstances from those of the plates prepared last. As a result, systematic errors creep in among the ordinary variability and confuse the issue.

We do not intend to assert that series of only 10 parallel determinations are too small to indicate the accuracy of their means (*m*) by stating the probable errors of these means, but the probable errors will vary very much in extent from series to series. After all, the probable error expressed as a percentage of the mean may be looked upon as an expression for the degree of variability. The calculation of the probable error of the mean or of any other expression for the magnitude of the variance in each small series does not show, therefore, whether the determinations is done faultlessly or not. Even some ugly large probable errors may fit in with the laws of probability and thus do not point at all to an abnormal variance.

Only when a large number of such short series of parallel determinations are taken together and the variance of all these series — expressed by some suitable quantity is considered and compared, it will be possible to make out whether the variances in general are normal or not, for if the determinations have been carried out faultlessly the variances of the separate series will be bound to group themselves round an average value in accordance with a distribution to be described below. But if the variances are grouping themselves in another manner and the large or the small variances predominate, this will therefore point to faults in the determination. It goes without saying that the series thus summarized must be sufficiently numerous to render possible a distribution approaching the ideal and furthermore that all these series should be really comparable.

The material collected in the course of several years at the microbiological Laboratory of the Zuider Zee reclamation works perfectly fulfills the

two latter demands, for of late years the plate counting technique has been applied unaltered and in a perfectly standardised form and the number of series of 10 parallel plates each is very great. After eliminating all the series obtained in a manner deviating in any way from the normal, as well as all series with too high or too low means, the material which can be compared amounts to:

409 series of the determination of the number of bacteria and Actinomycetes acting upon starch,

444 series of the determination of the number of bacteria and Actinomycetes acting upon proteins and

376 series of the determination of the so-called "Total number" of bacteria and Actinomycetes in the soil.

This material could thus be submitted to a check of the variance, in order to trace any errors influencing this variance.

The determination of the total number of bacteria and Actinomycetes was effected on a semi-synthetic and quite reproducible culture medium, but a medium, that at the same time had a rather complete composition, thus permitting the development of as many different organims as possible (14; 15; 16):

1.5% agar
0.025% albumen, dissolved in NaOH
0.05% K_2HPO_4
0.02% $MgSO_4 \cdot 7$ aq.
0.1% dextrose
traces of $FeCl_3$
in tap water.

All the colonies of bacteria and Actinomycetes which developed were counted.

The number of the organisms acting upon starch and protein, on the other hand, was determined on selective, but also as far as possible synthetic culture media. Here not all the visible colonies were counted, but only those which were surrounded by the specific fermentation-zones. In the rest the technique of the counting was the same for all three determinations. Bacteria and Actinomycetes were not distinguished but were counted together as it is sometimes difficult to recognize the difference with the naked eye, and a microscopic control would take too much time. Other physiological groups (those disintegrating fats, cellulose or others) were also counted as a rule by the plate method, but the number of series is much lower in that case, so that these results are less suitable for submission to a mathematical check. In the following pages, therefore, this check will only be applied to the above-mentioned series of organims acting upon starch and protein and to those of the total number of bacteria and Actynomycetes.

Before proceeding thereto, however, it must be briefly indicated how this check can best be carried out. R. A. Fisher has worked out and applied an excellent statistical control method for the small parallel series of plate countings occurring in bacteriological investigation (3; 4; 5; 6; 11). As the deviation of this method from the laws of probability is spread over several of Fisher's publications, it will be briefly summarized here for the sake of convenience, Fisher's reasoning being followed as closely as possible. In the following four stages we shall try to reproduce Fisher's derivation: 1. It is demonstrated that the numbers of colònies on plates (in other words the number of bacteria brought on the plates by inoculation) are distributed corresponding to the Poisson series; 2. Attention is drawn to an important property of this distribution, of which further use will be made; 3. A law is deduced

for the occurrence of a system of n deviations in case a normal distribution is present; 4. It is shown that the last-mentioned law also holds good for comparatively small series of a Poisson distribution, which yields the test, to which the material was submitted.

1. The distribution of the numbers of colonies on the parallel plates is in accordance with a Poisson distribution.

This may be demonstrated as follows (9): It is assumed that a series of n plates is inoculated with a suspension of bacteria containing N bacteria per v cc. using one cc. of this suspension for each plate. The chance of a certain bacterium getting into the inoculation pipette is $\frac{1}{v}$, that it escapes $\frac{v-1}{v}$. The chance that n previously indicated bacteria get into it is consequently $\left(\frac{1}{v}\right)^n \cdot \left(\frac{v-1}{v}\right)^{N-n}$. This multiplied by the number of ways in which n elements can be chosen from N: $\frac{N!}{n!\,(N-n)!}$ then yields the probability for the fact that n arbitrary bacteria from the inoculation suspension will be drawn into the pipette. The product is then recognized as a term of the polynomial: $\left(\frac{v-1}{v}+\frac{1}{v}\right)^N$ which in fact represents the sum of the chances that not a single, one, two, ... etc. up to N bacteria get into the pipette, and is consequently equal to unity. There is no objection to N and v being taken very large, whilst $\frac{N}{v}$ may be equated to a certain value m. After transformation, and, bearing in mind that $\left(\frac{v-1}{v}\right)^N = e^{-m}$ the above polynomial may the be written as the so-called Poisson series:

$$e^{-m}\left(1+m+\frac{m^2}{2!}+\frac{m^3}{3!}+\ldots+\frac{m^x}{x!}+\ldots\right)=e^{-m}\sum_{x=0}^{x=\infty}\frac{m^x}{x!}$$

which again represents, term after term, the chances that not a single, one, two, ... etc. bacteria happen to get on to each plate[1]). If these last numbers are multiplied respectively by the corresponding terms of the series and then added, the mathematical expectation for the average number of bacteria per plate will be found. This leads, as will be comprehended, to the value m:

$$e^{-m}\sum x\frac{m^x}{x!}=e^{-m}\sum m\frac{\delta}{\delta m}\cdot\frac{m^x}{x!}=e^{-m}\cdot m\frac{\delta}{\delta m}\cdot\sum\frac{m^x}{x!}=e^{-m}\cdot m\frac{\delta}{\delta m}e^m=m\,.$$

2. The following applies to a Poisson distribution: the mathematical expectation of the average square of the deviation (the „variance" σ^2 is equal to the mean:

$$\overline{(x-m)^2}=e^{-m}\sum\left(x-m\right)^2\frac{m^x}{x!}=e^{-m}\left(m\frac{\delta}{\delta m}-m\right)^2\sum\frac{m^x}{x!}=e^{-m}\left(m\frac{\delta}{\delta m}-m\right)^2 e^m=$$
$$e^{-m}\left[m\frac{\delta}{\delta m}m\frac{\delta}{\delta m}e^m-2m^2\frac{\delta}{\delta m}e^m+m^2e^m\right]=$$
$$e^{-m}\left[(m^2+m)\,e^m-2\,m^2e^m+m^2e^m\right]=m\,.$$

3. It is known that in the case of a normal distribution the chance of meeting with a deviation from the mean $(x-m)$ for an observation is proportional to $e^{-\frac{(x-m)^2}{2\sigma^2}}$, δ^2 representing the variance.

The chance that a set of n observations x_i occurs is then proportional to:

$$e^{-\sum\limits_i\frac{(x_i-m)^2}{2\sigma^2}}\,. \qquad a)$$

[1]) The sum of the chances here again is equal to unity:

$\sum_{x=0}^{x=\infty}\frac{m^x}{x!}$ being equal to e^m.

This expression retains this same value for all those sets of observations which satisfy the relation: $\sum_i \frac{(x-m)^2}{\sigma^2} = \chi^2$ in wihch χ^2 is a constant. Now it is necessary to know in how many ways such a combination of x_i values may be found. This can be enumerated best by reading the relation as the equation for an n-dimensional sphere the radius of which is equal to χ, $\frac{x_i - m}{\sigma}$ being the coordinates. Each point in this space is connected with a set of values of x_i. The required number is therefore proportional to the volume of the hyperspherical shell, which in turn is proportional to $\chi^{n-1} d\chi$. The chance of meeting with a certain χ^2 for n observations may be formulated as the product of the last-mentioned number and the expression a):

$$\frac{\chi^{n-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi}{\int_0^\infty \chi^{n-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi}.$$

The constant factor is determined by the integral in the denominator which brings the sum of the chances to unity. Fisher gives (6) a table in which the values of χ^2 are shown for increasing values of

$$P = 1 - \frac{\int_0^\chi \chi^{n-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi}{\int_0^\infty \chi^{n-1} e^{-\frac{\chi^2}{2}} d\chi}$$

and for various values of n (χ is then the upper limit of the integral in the numerator). For every χ^2 and n it therefore yields the chance P, that χ^2 will be greater than the value shown in the table.

4. The last relation will now be applied to the bacteria countings in question, by which means it will be investigated whether the fluctuations which occur are really to be attributed entirely to chance. It should be borne in mind, however, that in this case we do not deal with a normal, but with a Poisson-distribution. The resulting difference is that the x_i now no longer are continuous variables, for they are whole numbers. The result is that the number of points in the shell of the hypersphere diminishes but if x_i, the number of bacteria that gets on to each plate, is not too small and n, the number of parallel plates, is also sufficiently large, then the number of points in the hyperspherical shell will be sufficiently large to guarantee the validity of the above law, especially with the large jumps in the values of χ^2 ("thick" shell of the sphere), which are used below[1]). The use of the exponential term a) is then also permissible. It may be expected, therefore, that the χ^2 distribution is applicable to bacterial countings.

To test this distribution the χ^2 should be calculated for each series of plates. As we saw under 2, σ^2 may be replaced by m. But m, the mathematical mean, is an unknown quantity. It is therefore replaced by its nearest approximate value $\bar{x} = \frac{\Sigma x_i}{n}$. In this manner

$$\chi^2 = \sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\bar{x}}$$

is calculated. The result of this substitution of $\bar{x}$ for m will be that the arbitrary character of the n deviations is reduced, in so far as now only $n - 1$ values are subject to chance (one of the values of x_i being fixed by the condition $\Sigma x_i = n\bar{x}$). The

[1]) The validity was found to be maintained undiminished, see below, even with only ten parallel plates and $x =$ about 15.

consequence is that from the table the values of χ^2 belonging to $n - 1$ and not those belonging to n must be consulted. As the series dealt with here consist of ten parallel plates, we look up $n - 1 = 9$ in Fisher's table and find:

$P =$	0,99	0,98	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01
$\chi^2 =$	2,1	2,5	3,3	4,2	5,4	6,4	8,3	10,7	12,2	14,7	16,9	19,7	21,7

Therefore it is now possible to examine whether the found χ^2 values of the material to be investigated are distributed over these χ^2 classes in the same way as those of imaginary ideal countings. If this is not the case there must be systematic faults in the counting, which influence the χ^2 values.

This statistical control method suggested by Fisher is the only one by means of which short series can be checked. Therefore it was decided to subject the plate counting material of the micro-biological laboratory of the Zuyder Zee reclamation works to this control.

We had therefore to commence with the calculation of the χ^2 values of all the available series. The values obtained are then arranged in order of magnitude and divided into classes, the following class boundaries being adopted, in accordance with Fisher's table:

smaller than 2.1; 2.1—2.6; 2.6—3.4; 3.4—4.2; 4.2—5.4; 5.4—6.4; 6.4—8.4; 8.4—10.7; 10.7—12.3; 12.3—14.8; 14.8—17.0; 17.0—19.8; 19.8—21.8; 21.8 and larger.

In figures 1, 2 and 3 the distribution of the calculated values over these classes is shown graphically, the ideal distribution for the same number also being shown.

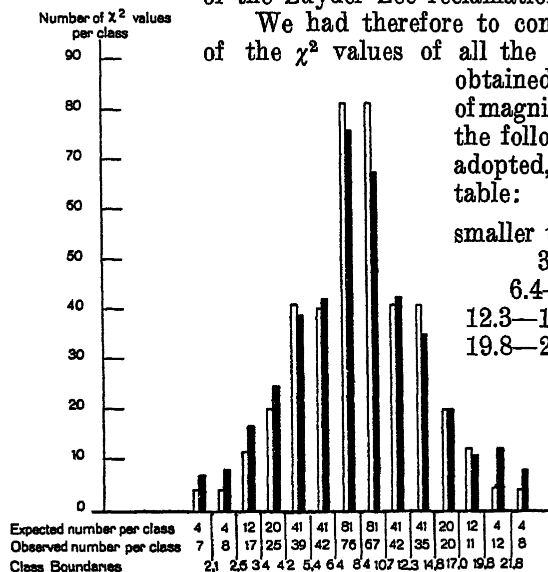


Fig. 1.
χ^2 distribution for starch disintegrating organisms.

It will at once be noticed in these figures that in the case of the organisms acting on starch and of those acting on protein the distribution found agrees very satisfactory with the theoretical. It is true that in the counting of the organisms acting upon starch (Fig. 1) the distributions compared with the theoretical, is somewhat levelled, as a result of the fact that the extreme values of χ^2, comparatively speaking, occurred somewhat too frequently, and in the case of those acting on protein (Fig. 2) the right wing of the distribution is somewhat too pronounced, as a result of the too large number of series with great variance, but generally speaking the co-ordinations of the distribution of the χ^2 values found and expected cannot be considered as otherwise than satisfactory. These countings therefore, appear to be practically free from errors, which show up in an abnormal distribution. In the countings of the total number of microbes (Fig. 3), however, the distribution found deviates very much from the theoretical, as there is a pronounced preponderance of the large and very large and a shortage of small χ^2 values. Of course the very marked accumulation in the

highest class is to a large extent only apparent, being the result of the choice of the class boundaries. All values greater than 21.8 have been collected in the highest class, while they would have been spread over several classes if the division into classes had not been arbitrarily broken off here, but carried on further upwards. But even if the highest class had been split up in this way, no more favourable picture would have been presented. On the contrary, it would only in that case be seen what variances may occur, as it could then be observed that some χ^2 values are greater than 60. Therefore there must be factors at work which greatly increase the variation of the separate plates in most series, rendering the mean more inaccurate and more unreliable. This shows clearly that the determination of the total number of bacteria and Actinomycetes is subject to errors.

This check of the χ^2 distribution is a very striking proof of the rule that one cannot be too careful about relying on some method of determination or other, especially where living organisms are concerned, as numerous unforeseen and often hidden difficulties may crop up. After all, in this case all possible precautionary measures had been taken to render the countings strictly reproducible and exact, so that it was con-

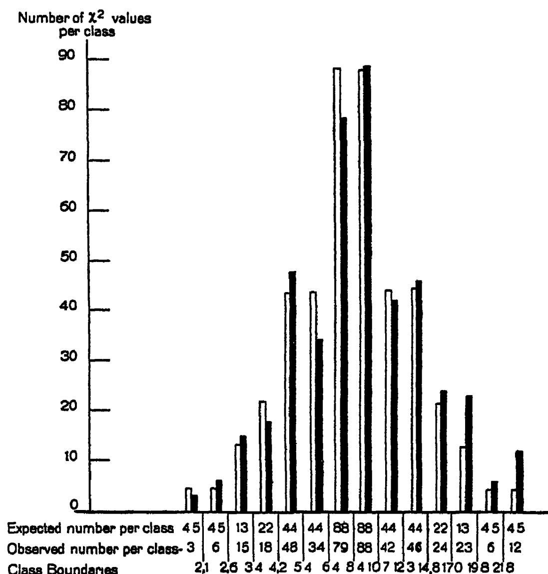


Fig. 2.
χ^2 distribution for protein disintegrating organisms.

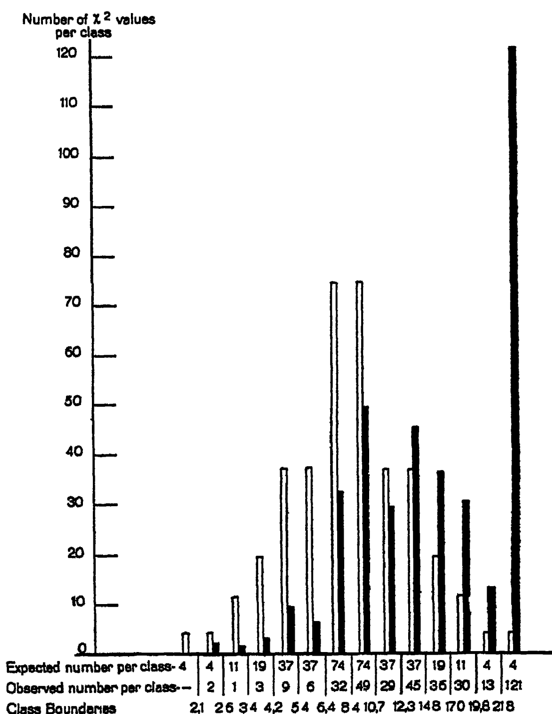


Fig. 3. χ^2 distribution for the total number of bacteria and Actinomycetes.

sidered to be a good method, and yet the check described above has irrefutably proved that the counting technique employed does not always lead to good and reliable results. In the case of the determination of the total number of bacteria and Actinomycetes its results are rather unsteady. Any well founded method of working should really be submitted to a similar statistical examination before being recommended as thoroughly reliable, at least if sufficient comparable analysis material is available.

Such a check, however, reveals nothing as to the reasons for the abnormal variance of parallel determinations, that is, about the nature of the errors. In the present case, too, the bad result of the countings of the total number of bacteria and Actinomycetes had to be regarded solely as a warning that there was something wrong, but at first we were quite at a loss concerning the cause of the deviation. The first attempt to find an explanation of this deviation was a renewed and very painstaking check of the technique of the plate counting. All possible errors, such as the possibilities of infection during the work, difference in temperature between the cooled tubes with the culture medium, the possible insufficient sterilisation of the Petri-dishes, pipettes, test tubes and other instruments, the possible insufficient rinsing of the glassware after it had been boiled with soda, the settling-speed of the inoculation-suspension and many others were again thoroughly considered, but no source of perceptible errors could be discovered. As a matter of fact most of these possibilities of errors were a priori improbable, as only the countings of the total number of bacteria and Actinomycetes showed too widely spreading results, whereas the countings of the physiological groups of organisms acting upon starch and those acting upon proteins were practically unimpeachable.

Thereupon just this last fact was adopted for guidance and the question was put: in what respect does the counting of the total number of bacteria and Actinomycetes differ from the countings of the starch and protein disintegrators. In the first place it is the culture medium, which in the case of the counting of the total number of bacteria is as all round as possible, whilst for the counting of the starch and protein disintegrators it is strictly selective. In the second place, when counting the physiological groups not all the colonies which have developed on the plate are counted, but only those which are surrounded by a perceptible fermentation zone. And in the third place the dilutions of the inoculation suspension are chosen in order to ensure the appearence of ± 100 colonies on each plate when counting the total number of bacteria and Actinomycetes and of only ± 20 colonies when counting the representatives of the physiological groups. At first no clue to any possible errors could be derived from the first two points of difference. In order to ascertain whether the reason was to be found in the third point, the available 376 series of the counting of the total number of bacteria and Actinomycetes were divided into classes according to the size of their means, viz. above 200; 200—115; 115—85; 85—50 and under 50. If the reason for the occurrence of a higher variability of parallel plates was indeed the higher number of colonies which developed on a plate with the result of a more pronounced antagonistic toxic action upon one another of various bacteria, it would be natural to expect that the classes with the high means wold show greater variations than those with the low means. But this also led to nothing, as the distributions of the χ^2 values separately

set out for each of the above classes were all equally bad and deviated very much from the ideal.

As a last resource it was then decided, before undertaking further investigations as to the reason for the deviation, to compare the material dealt with here with analogous material collected by other investigators and to submit their material to the same check of the χ^2 distribution in order to see whether the lack of agreement found between the expected and the actual distribution in the counting of the total number of bacteria was a universal phenomenon or only occurred at the micro-biological laboratory of the Zuider Zee reclamation works. It was not easy to secure suitable and really analogous material, for the countings are hardly ever carried out in sufficiently great numbers, and even then a few parallel determinations are considered to be sufficient (as a rule 2 or 3 and at most 5, instead of 10 as in the material dealt with here). Finally, the material collected in the years 1920—21 by S. A. Waksman of the New Jersey agricultural experiment station was found to be very suitable for the object in view (15), and Professor Waksman was kind enough to allow his material to be used. It refers to countings of the total number of bacteria and Actinomycetes in various fertilizing plots. The culture medium used is also a semi-synthetic one and almost the same as that used by the present writers:

0.05% K_2HPO_4
0.02% $MgSO_4 \cdot 7$ aq.
1.0 dextrose
0.025% egg-albumen
traces of $Fe_2(SO_4)_3$
1.5% agar
in distilled water.

Also in other respects the working method was in principle the same, except that the incubation temperature was somewhat lower ($\pm$ 26° C.) (instead of $\pm$ 29° C.) and the counting was done with the naked eye, so that the very smallest colonies certainly were not counted. The number of parallels was also sufficiently high (189) to guarantee a reliable distribution of the χ^2 values. Thus there was nothing against submitting Waksmans figures to the same statistical check as those collected in this laboratory.

The result of this investigation is shown graphically in Fig. 4, in which

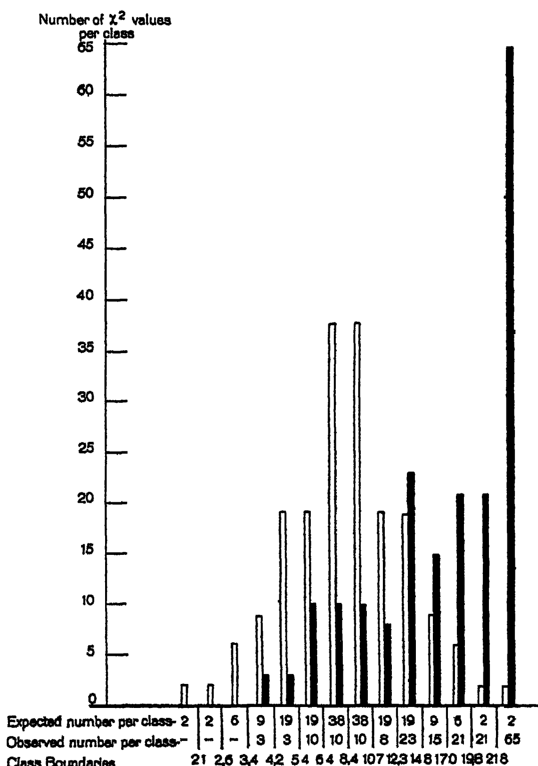


Fig. 4. χ^2 distribution for the number of bacteria and Actinomycetes in the countings of Waksman.

the same lack of agreement between the ideal distribution of the χ^2 values and that found by experiment is as clearly apparent as in the case of the investigation shown in Fig. 3. Here again a very decided preponderance of large and a shortage of small χ^2 values. This gave the impression, therefore, that the predominance of too high variances is a regular phenomenon in plate countings of the total number of bacteria and Actinomycetes and not caused by errors occurring only in this laboratory.

Waksman, however, not only counted together bacteria and Actinomycetes on his plates, but also the Actinomycetes separately, and thus obtained a second figure for each plate. If this Actinomycetes figure is submitted to the same check of the χ^2 distribution, it is surprising that quite a different picture is presented from that furnished by the figures for bacteria and Actinomycetes together. The Actinomycetes show a much better agreement between the expected distribution and the one which is found experimentally, as is clearly shown in Fig. 5. Here the distribution of the values found may even be called very satisfactory. The only respect in which it deviates from the theoretical is a slight levelling tendency, that is a preponderance of the extremely high and extremely low χ^2 values, the same as already found when counting the starch disintegrators. Too high a percentage of the high values hardly occurs, however.

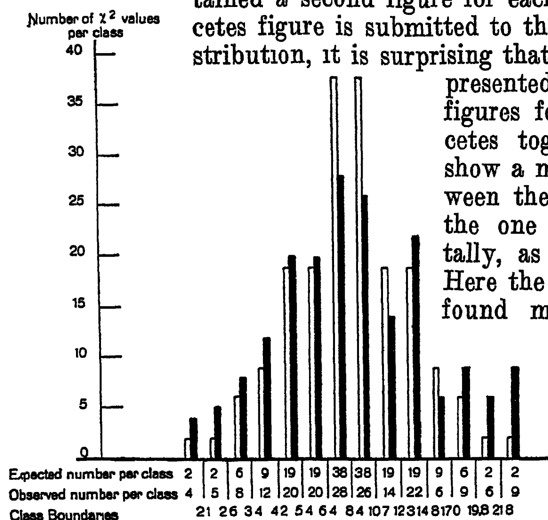


Fig. 5. χ^2 distribution for the Actinomycetes alone in the countings of Waksman.

This difference between the countings of the Actinomycetes alone and of the bacteria and Actinomycetes together is all the more striking, as both values are derived from the same countings and the same plates and therefore based upon quite the same counting technique. And yet the counting of the Actinomycetes is satisfactory, whilst that of the Actinomycetes and bacteria together is very inconstant and unreliable. The abnormally great spread is therefore only to be attributed to the bacteria.

Unfortunately, the laboratory of the Zuider Zee reclamation works has not at its diposal countings of Actinomycetes alone, so that it cannot be investigated whether these would also show a normal χ^2 distribution here. Yet this different behaviour of Actinomycetes and bacteria has finally been an indication that the explanation of the abnormally great variability of parallel determinations of bacteria numbers should be looked for in the influence which the various organisms developing upon one plate have upon one another. Antagonistic-toxic influences which some microorganisms, especially fungi and Actinomycetes, exercise upon others are generally known and are very frequently observed. Fisher, Thornton, and McKenzie (11) have already indicated the increase of the variance of

parallel determinations as a possible result of this antagonistic action of various microbes upon one another. It is quite possible that the lack of agreement between the ideal and the observed distribution of χ^2 values found in the countings of bacteria and Actinomycetes by Waksman and the present writers is to be attributed in part to such a suppression of the development of certain microbes in the neighbourhood of colonies of other species which have a toxic effect. The influence of these antagonisms cannot be very great, however, at any rate in the case of the countings as carried out in the laboratory of the Zuider Zee reclamation works, as repeated experiments showed that but rarely strains could be isolated from these countings which did any harm to the development of the neighbouring colonies of other microbes. In the few cases in which this was stated, nearly always fungi or Actinomycetes were acting antagonistically upon bacteria. Reciprocal cases, that is, injury to Actinomycetes by bacteria, or mutual antagonisms between Actinomycetes or bacteria were of much rarer occurrence.

In addition to the antagonistic action of various microbes there must be therefore other reasons for the abnormally great variance of parallel countings. Fisher, Thornton and McKenzie, in the above-mentioned publication, also indicate a second source of errors, viz. the formation of daughter colonies round a parent colony, as some bacteria often do. When all the colonies are counted separately, such swarms of colonies naturally greatly increase the number on the plate concerned. But this cause of erroneous countings cannot have had a great influence either, considering the working-method adopted at this laboratory, as the staff charged with the counting is very well trained and easily recognises such swarms of colonies. Consequently, all the countings in which they occurred were eliminated in the χ^2 distribution check referred to above, so that only a few inconspicuous cases can have passed unobserved.

Finally it was suspected that the influence at work might be the opposite of antagonisms, viz. the favouring of one another by various microorganisms. Our attention was drawn the more to this suspicion because at the time of this investigations the question of the symbiosis of various micro-organisms in the soil was just being studied at the laboratory of the Zuider Zee reclamation works. As a result of this investigation it was found that the phenomenon of symbiosis and the mutual favouring of various microbes was of much more frequent occurrence than is generally assumed. Some processes, such as the disintegration of the cellulose in the soil are even largely effected by mutual action of various organisms. This very general phenomenon cannot be dealt with more fully here, and in this connection the reader is referred to a communication specially devoted to this question which will be published shortly. It must be pointed out, however, that in most cases this mutual favouring is not very specific and that it is in fact a question of the production by some micro-organisms of vitamins or other substances promoting growth which are widely distributed among animals and plants, whilst other species are unable to do so. This makes them dependent upon the growth-promoting substances produced by the first group.

The first communications concerning the formation of certain growth-promoting substances by some microbes by which others profit are already old and date from 1892 and the following years (Schreider, Turro, Graßberger and Wildiers [27; 28; 25; 32]), whilst later more and more communications on this subject saw the light. It is true that most of the cases were concerned with pathogenic organisms, but of late several in-

vestigators have advanced the view that this phenomenon is very general and occurs in all groups of micro-organisms (see especially Linossier, Barthel, Sanborn and Hughes [38; 39; 29; 30; 40], but also many other publications). As a matter of fact this mutual favouring of different microbes — certain bacteria only developing around the colonies of another organisms and forming zones of „satellite" colonies — is to be met with almost daily. Finally the opinion was expressed already by Linossier (39) and later more positively by Hughes (40) that the micro-organisms must be divided into species which can form no or at any rate not all of the vitamins which are required to keep them alive, and which are therefore unable to develop on synthetic culture media which are lacking in vitamins, and others which can do so. On synthetic culture media the first group is therefore dependent upon the production of the required growth-promoting substances by representatives of the second group which may be in their neighbourhood. Fungi and Actinomycetes are found to belong almost exclusively to the second group, in which respect they resemble the higher plants, whilst among the bacteria in addition to similarly independent species, many species occur which, just as with the higher animals, are dependent upon growth-promoting substances produced by other living creatures. In anticipation of still unpublished investigations on this subject, it must be stated here in order to understand the above better, that principally the bacteria which grow slowly and whose lytic powers are weak (as also of most of the pathogenic species) require the supply of growth-promoting substances from outside. The species, however, which are lytically active and, are able independently to effect an energetic disintegration of proteins, starch, other hydrocarbons and the like can as a rule produce the growth-promoting substances themselves and so are able to grow on purely synthetic culture media.

Now if it is assumed that on the plates develop next to one another bacteria which are themselves unable to form all the necessary growth-promoting substances and other organisms which are capable of doing so, and it is further assumed that most of the latter only form the growth-promoting substances endogeneously, so that their neighbours cannot profit by them, whilst only a few colonies are formed of the species which cause great quantities of the growth-promoting substances to be diffused in the culture medium, so that the phenomenon of satellitism occurs around them, then it is quite conceivable that as a result the total number of colonies that develop on a plate is influenced very unequally from plate to plate. It is true that for this a very definite numerical ratio is required between the favouring germs in the inoculation suspension and those which are dependent upon this favouring. The former must only be present in small number, so that with the dilution used averagely only a few of them will appear on each plate, whilst those species which react to the growth-promoting substances exuded by them must be much more numerous. Only in that case will the production of the ggrowth-promoting substances vary very much from one plate to another — from none on the plates where no suppliers of growth-promoting substances have developed to a good deal on plates on which several of these colonies have developed. The consequences of this great variability in the content of growth-promoting substances — sometimes amounting to several hundred per cent — is sharply expressed by the satellite organisms, which were inoculated in far greater numbers and so are represented fairly evenly on all plates.

At first sight the above explanation appears to be very artificiel, just

because a very definite ratio is required between the number of exogenic vitamin-forming microbes and those which depend upon these vitamins, but on further examination it will be found that the chance of this condition being fulfilled is not so small. Hughes (40) was already able to ascertain that by far the greatest majority of organisms producing growth-promoting substances formed them only endogeneously and that the number of sorts which yielded up these growth-promoting substances to their surroundings was limited, whilst further investigations on this subject have shown more quantitatively that at most a few per cent of all the organisms developing on the plates give off vitamins externally. Moreover, it will be seen from graphs 3 and 4 that all series do not show abnormally high variability, but that many series also occur with perfectly normal variances; these are the series in which either the number of organisms yielding up growth-promoting substances was so high that a fairly constant amount of these substances was formed on all plates, or on the contrary practically nil, so that vitamins were formed on none of the plates.

Indeed, it is a generally known fact that biogenous growth-promoting substances which cannot be more precisely defined influence the development of bacteria on plates very much. To this fact the better development and the formation of a higher number of colonies on natural organic culture media than on strictly synthetic ones must be attributed. The influence which various microbes exercise upon one another in the case of plate countings has also been observed long ago. Salkowsky (41) reported this as early as 1892. This influence is also the reason why the highest results of bacteria countings on plates are not found with very high dilutions, in which case only very few colonies develop per plate, but with the use of much lower dilutions which give rise to 30 to 50 colonies per plate.

Supported by all these considerations, it was therefore decided to make an effort to prove this assumption experimentally by carrying out a series of countings in two different culture media, one being practically synthetic, viz. the ordinary medium used in this laboratory, with which the results shown in Fig. 3 were also obtained, and the other the same synthetic medium, but with an entire addition of extracts rich in growth-promoting substances, viz. 1% yeast extract and 10% soil extract[1]). In order to obtain series which were otherwise perfectly comparable they were always prepared both at the same time and from the same inoculation suspension and treated in exactly the same manner. In this way 40 countings were carried out in the course of a few months, as usual in 10-fold. Even 40 series is really too small a number for checking the χ^2 distribution, and therefore this distribution will of course be very variable and show great fluctuations, but such double countings are very expensive and take a great deal of time. Consequently an effort was made with only 40 series, as it was argued that if the two series were going to show a striking difference in χ^2 distribution this difference would probably appear as well in a small number of countings, but if this were not to be the case, the double counting could then be continued.

The result of this χ^2 check was very satisfactory. It is shown in Fig. 6, which gives the series with the ordinary synthetic culture medium and in Fig. 7, representing the series with the altered medium. The distribution

[1]) "Soil extract" is a watery decoction of normal clayey soil (2 L. from 1 kg. of soil). "Yeast extract" is a watery decoction of pressed yeast (5 L. from 1 kg. of yeast).

is indeed still very irregular (especially in the synthetic series) yet the difference between the two media is striking:

The medium provided with growth-promoting substances shows a distribution of χ^2 values which as yet does not quite tally with the ideal distribution and which still shows a clear predominance of the series with too high variance, but all the same this distribution is considerably better than the one obtained when the synthetic medium without vitamins is used. The results on the latter agree in principle with the distributions shown in Fig. 3 and 4, as obtained by the examination of material of the present writers and of Waksman.

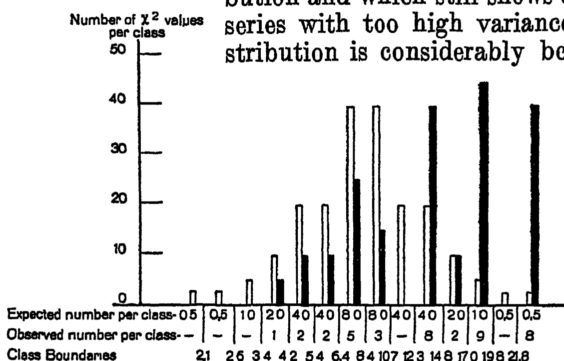


Fig. 6. χ^2 distribution for the special countings upon the synthetic medium.

This result thus showed clearly that the abnormally great variability between parallel plates in the case of bacteria countings on synthetic media is at least partly due to lack of certain essential growth-promoting substances in these media. So this is an inherent disadvantage of synthetic media, which renders them less suitable for bacteria countings. It is still questionable, however, whether this drawback should be considered serious enough to condemn the use of these media for plate countings, for the great advantage of synthetic media, viz. their reproducibility, remains undiminished. Figures obtained upon synthetic media can always and everywhere be compared with one another. Besides, the absolute error which can be made with media without growth-promoting substances can never be very great. A comparison of the means obtained in the above counting on a medium containing growth-promoting substances and on an analogous medium lacking such substances gives some indication of the magnitude of the error which the use of synthetic media may cause. The two average values of the means of these two series are 63.4 on the ordinary synthetic medium and 71,4 on the medium with soil-, and yeast-extract. So the difference amounts to some 11% of the highest value (of the medium containing growth-promoting substances). Consequently the fact that the χ^2 distribution was fairly satisfactory on the medium containing growth-promoting substances shows, that a sufficient concentration of these substances was present here on all the plates, so that the average of this series could not be raised by further addition of these substances. The χ^2 distribution being very

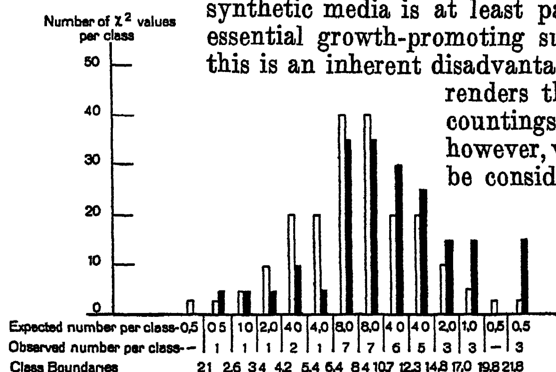


Fig. 7. χ^2 distribution for the special countings upon the vitamin-containing medium.

bad on the media without growth-promoting substances, shows equally clearly, however, that in this case the quantity of growth-promoting substances produced on the various plates varied very much, and so that there were only a few colonies of organisms yielding growth-promoting substances on each plate. Therefore it may rightly be expected that in another soil sample, in which the number of organisms producing growth-promoting substances exogenously is lower, not one of these organisms, on an average, would develop per plate, so that all the plates would be without growth-promoting substances. The numbers thus obtained would then vary again normally, but would be still lower, thus agreeing in principle with the lowest numbers found in the above counting on the medium without growth-promoting substances. In that case, therefore, an error would be made compared with the maximum (when growth-promoting substances were present on all plates) which would be still larger, probably about twice as large, as the difference now found, thus amounting to about 22% of the maximum average. The error due to the lack of growth-promoting substances in the medium cannot be much larger than this, however.

In view of the fact that the number of comparative countings on the ordinary medium and on the medium provided with growth-promoting substances is still very insufficient, the above results of the χ^2 check are for the present only to be accepted with the necessary reserve. This communication must therefore be regarded as a provisional one, and the comparison of the culture media will be continued.

Summary.

After a short review of the statistical control method suggested by R. A. Fisher, in its application to plate-countings of microbes, the material collected at the microbiological laboratory of the Zuider Zee reclamation works is subjected to this control.

By this it is clearly shown, that the numbers found upon the parallel plates have an abnormal variance, which considerably deviates from what was expected by reason of the laws of probability.

Similar plate-countings of S. A. Waksman, submitted to the same control, had the same bad variability. The reason of this phenomenon must thus be a general one, often met with in plate-countings of bacteria from soil.

An inquiry into the reasons of this abnormal variance showed, that in addition to different already mentioned factors (antagonisms between different organisms on a plate, swarms of doughter-colonies of spreading organisms, etc.) an important part is played by the absence of vitamins and other growth-promoting substances in the employed culture medium. An addition of extracts rich in such substances (yeast- and soil-extracts) to the culture medium improved considerably the variability of the countings, but the reproducibility of the medium was by this absolutely abandoned.

References.

1. "Student", On the error of counting with haemocytometer. (Biometrica. Vol. 5. 1907. p. 351.) — 2. Fisher, R. A., On the mathematical foundations of theoretical statistics. (Phil. Trans. A. Vol. 222. 1921. p. 309.) — 3. Fisher, R. A., On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of *P*. (J. R. Stat. Soc. Vol. 85. 1922. p. 87.) — 4. Fisher, R. A., The conditions under which χ^2 measures the discrepancy between observation and hypothesis. (J. R. Stat. Soc. Vol. 87. 1924. p. 442.) — 5. Fisher, R. A., Applications of "Student's" distribution. (Metron. Vol. 5. 1926. Part 3. p. 90.) — 6. Fisher, R. A., Statistical methods for research workers. London 1930. 3-rd ed. — 7. Pearson, K., Tables

for statisticians and biometricians. Cambr. Univ. Press. 1914. — 8. Pearson, K., On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. (Phil. Mag. Ser. V. Vol. 50. 1900. p. 157.) — 9. Greenwood, M., and Yule, G. U., On the statistical interpretation of some bacteriological methods employed in water analysis. (Journ. of Hyg. Vol. 16. 1918. p. 36.) — 10. Yule, G. U., On the application of the χ^2 method to association and contingency tables, with experimental illustrations. (J. R. Stat. Soc. Vol. 85. 1923. p. 95.) — 11. Fisher, R. A., Thornton, H. G., and Mac Kenzie, W. A., The accuracy of the plating method of estimating the density of bacterial populations. (Ann. of Appl. Biol. Vol. 9. 1922. p. 325.) — 12. Thornton, H. G., On the development of a standardised agar medium for counting soil bacteria, with especial regard to the repression of spreading colonies. (Ann. of Appl. Biol. Vol. 9. 1922. p. 241.) — 13. Waksman, S. A., Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: I. The mathematical interpretation of numbers of microorganisms in the soil. (Soil Science. Vol. 14. 1922. p. 81.) — 14. Waksman, S. A., Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: II. Methods of the study of numbers of microorganisms in the soil. (Soil Science. Vol. 14. 1922. p. 283.) — 15. Waksman, S. A., Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: III. Influence of fertilization upon numbers of microorganisms in the soil. (Soil Science. Vol. 14. 1922. p. 321.) — 16. Waksman, S. A., and Fred, E. B., A tentative outline of the plate method for determining the number of microorganisms in the soil. (Soil Science. Vol. 14. 1922. p. 27.) — 17. Engberding, D., Vergleichende Untersuchungen uber die Bakterienzahl im Ackerboden in ihrer Abhangigkeit von äußeren Einflussen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 569.) — 18. Fischer, H., Zur Methodik der Bakterienzählung. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 25. 1910. S. 457.) — 19. Brown, P. E., Media for quantitative determination of bacteria in soils. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 38. 1913. S. 497.) — 20. Cunningham, A., A note on the plate method for enumeration of bacteria. (Journ. of Hyg. Vol. 13. 1913. p. 433.) — 21. Conn, H. J., Culture media for use in the plate method of counting soil bacteria. (New York Agric. Exp. Stat., Techn. Bull., No. 38. 1914.) — 22. Noyes, H. A., and Grounds, G. L., Number of colonies for a satisfactory soil plate. (Proc. Indiana Acad. Sci. 1918. p. 93.) — 23. Smith, N. R., and Worden, S., Plate counts of soil microorganisms. (Journ. of Agr. Res. Vol. 31. 1925. p. 501.) — 24. Mudge, C. S., and Lawler, B. M., Is the statistical method applicable to the bacterial plate count? (Journ. of Bact. Vol. 15. 1928. p. 207.) — 25. Graßberger, R., Beiträge zur Bakteriologie der Influenza. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 25. 1897. S. 453.) — 26. Davis, D. J., Food accessory Factors (Vitamins) in bacterial culture with especial reference to haemophyllic bacilli. I. (Journ. of Inf. Dis. Vol. 21. 1917. p. 392.) — 27. Schreider, M. v., Über Mischkulturen von Streptokokken und den Diphtheriebazillen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 12. 1892. S. 289.) — 28. Turró, R., Über Streptokokkenzüchtung auf sauren Nahrböden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 17. 1895. S. 865.) — 29. Barthel, Chr., Influence des moisissures sur les ferments lactiques. (Le Lait. Vol. 4. p. 725.) — 30. Sanborn, J. R., Physiological studies of association. (Journ. of Bact. Vol. 12. 1926. p. 343.) — 31. Dooren de Jong, L. E. den, Über Micrococcus Eykmanii n. sp., ein Bakterium, welches für sein Wachstum vitaminartige Stoffe braucht. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 5. 1934. S. 1.) — 32. Vildiers, A., La Cellule. Vol. 18. 1901. — 33. Williams, R. J., Journ. of Biol. Chem. Vol. 38. 1919. p. 463. — 34. Jordan Lloyd, D., On vitamins, amino-acids and other chemical factors involved in the growth of the Meningococcus. (Journ. of Path. and Bact. Vol. 21. 1917. p. 113.) — 35. Goy, P., Les végéteaux inférieures et les facteurs accessoires de la croissance. (Compt. rend. hebd. séances l'Acad. Sci. T. 172. 1921. p. 242.) — 36. Func, C., and Dubin, H. E., Vitamine requirements of certain yeasts and bacteria. (Journ. of Biol. Chem. Vol. 48. 1921. p. 437.) — 37. Damon, S. R., Acid-fast bacteria as a source of vitamin B. (Journ. of Path. and Bact. Vol. 27. 1924.) — 38. Linossier, G., Les vitamines et les champignons. (Compt. rend. hebd. séances et mémoires Soc. Biol. 71-e Année. T. 82. 1919. p. 381.) — 39. Linossier, G., Les vitamines et les champignons. (Compt. rend. hebd. seances memoires Soc. Biol. 72-e Année. T. 83. 1920. p. 346.) — 40. Hughes, Th. P., Growth requirement of Staphilococci. (Journ. of Bact. Vol. 23. 1932. p. 437.) — 41. Salkowski, E., Bemerkung zu der Mitteilung von M. Nencky, Über Mischkulturen. (Zentralbl. f. d. med. Wiss. Bd. 30. 1892. S. 305.)

Nachdruck verboten.

Penicillium solitum Westling, ein Schädling der Lederindustrie.

[Aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn, Holland.]

Von **F. H. van Beyma** thoe **Kingma.**

In der Weißgerberei treten während der Verarbeitung des Leders häufig Schimmelpilze störend auf. Vor allen Dingen werden bei der Handschuhfabrikation die Halb- und Fertigfabrikate, besonders diejenigen aus Glacé, Nappa und Suède leicht von Penicillium befallen, während Hirsch- und Gemsleder weniger darunter zu leiden haben. Durch die reine weiße Farbe ist das sämischgare Leder besonders befähigt, die verschiedensten zarten Farben anzunehmen. Leider sind diese Farben zu gleicher Zeit sehr empfindlich; etwa auftretende Flecken können die Ware wertlos machen. Da nun bekanntlich Penicillium in dieser Hinsicht von den Handschuhfabrikanten sehr gefürchtet wird, kann es nicht weiter Wunder nehmen, daß man sorgfältig alle Maßnahmen trifft, welche das Aufkommen des Schädlings vom Anfang an verhindern können, zumal die Farbstoffzerstörung sehr rasch vor sich geht und es unmöglich ist, die einmal beschädigte oder zerstörte Farbe wieder herzurichten.

In der Literatur wird das Auftreten von Penicillium auf gegerbtem Leder meistens nur nebenbei erwähnt. So heißt es auf S. 29 des 5. Bandes von Lafars Handbuch der Technischen Mykologie: „Zu den Luft- und Wasserkeimen, welche in Gerbbrühen vorkommen, sind zu zählen: Penicillium glaucum, welches in der Regel in starken und stark sauren Brühen ansiedelt, Mucor mucedo und Oidium lactis."

Und auf S. 34 desselben Bandes: „. . . sind es bei Alaunleder hauptsächlich Penicillium und Mucor, welche dasselbe besiedeln und die sogenannten Stockflecken verursachen. Dies kann schon nach der Gare des Leders eintreten, wo von einer Erhitzung zwar nichts wahrgenommen werden kann, wo sich aber die Einwirkung der Kolonien durch eine Korrodierung der Narbe des Leders unangenehm bemerkbar macht. Bei feuchter Lagerung des Alaunleders treten die echten Stockflecken als Pilzwucherung auf, welche zuerst die Farbe des Leders zerstören (wenn es gefärbt ist), dann aber auch die Narbe angreifen und zerstören. Als Nährsubstrat für die Pilze kann hier das Mehl angesehen werden, welches für die Gerbung verwendet wird; der Alaun und das Salz der Gare wirken bekanntlich gegen die in Rede stehenden Pilze wenig oder gar nicht antiseptisch."

Ch. Thom (The Penicillia, 1930) gibt S. 127 an, daß auf Leder u. a. Penicillium rugulosum Thom gefunden worden ist, wo dasselbe jedoch anscheinend keinen erheblichen Schaden verursachte. Bergmann, Gramm und Vogel erwähnen in „Die Gerbung mit pflanzlichen Gerbstoffen (1931)" außer Penicillium glaucum, „der stark saure Brühen liebt", Mucor mucedo, „der auf feuchter Lohe wuchert und dessen Sporen mit dieser in die Brühe eingeschleppt werden" und Oidium lactis, „der ein häufiger Begleiter der Milchsäuregärung in Gerbbrühen ist". F. Stather bespricht in „Haut- und Lederfehler (1934)" nur im allgemeinen das Auftreten von Schimmelflecken und führt das Auftreten derselben auf die Verwendung alter verschimmelter Gerbbrühen,

sowie auf die Berührung mit schimmelinfizierten Teilen der Lagerräume und auf das Einlegen des Leders vor dem Stollen in schimmelinfiziertes Sägemehl zurück. Schließlich erwähnt Frl. Dr. J. Lloyd, einem Bericht in Le Cuir technique, Nr. 3, S. 39 ff (1934) zufolge, noch Fumago vagans Pers. als Ursache von schwarzen Flecken auf Leder. Dieselbe Forscherin berichtete in einer Versammlung von Lederzurichtern und Gerbern in Kettering (Engl.) (siehe: De Nederlandsche Lederindustrie, Nr. 36, S. 583, 1935) über einen bisher unbekannten Fall von übelriechenden Schuhen, wobei die Korkzwischensohle in neuen Schuhen derartig verschimmelt war, daß nach einem bis mehreren Tagen, in besonderen Fällen sogar nach einigen Stunden, ein derselben entströmender, ekelerregender Geruch weiteres Tragen unmöglich gemacht hatte. Über die näheren Ursachen dieses Geruches ist nichts bekannt, ebensowenig konnte die Frage geklärt werden, welche Substanzen unter dem Einfluß der Pilze in Zersetzung übergegangen waren; auch wurde leider der Pilz nicht näher bestimmt.

Aus obigem geht also hervor, daß bei der Lederbereitung des öfteren Penicillien festgestellt worden sind, eine genauere Untersuchung und Bestimmung der in Betracht kommenden Pilze jedoch nicht stattgefunden hat. Die Anfrage einer Handschuhfabrik um Aufklärung über die Art der Schimmelung eröffnete uns die Gelegenheit, auf die Sache etwas näher einzugehen.

Nach unseren Erfahrungen nun kann sich Penicillium sowohl auf der gefärbten wie auf der ungefärbten Seite des Leders ansiedeln, wobei nach einiger Zeit die Farbe an bestimmten Stellen ihren Glanz verliert und anfängt zahlreiche Stockflecken zu zeigen. Diese Stockflecken werden in holländischen Fachkreisen „Spoorvlekken“ genannt. In der Technik versucht man das Auftreten dieser Flecken durch Anwendung von Ammoniak zu verhindern. Dies geschieht in der Weise, daß das Leder vor dem Zuschneiden zwecks Geschmeidigmachen in Tüchern eingerollt wird, welche in einer Mischung von Wasser und Ammoniak untergetaucht und darauf ausgerungen worden sind. Dieser Prozeß wird dreimal wiederholt und jedesmal das Leder etwa ½ Stunde liegen gelassen. Wir erfuhren weiter, daß man in der Lederindustrie der Meinung ist, der Pilz werde auf diese Weise getötet und dadurch das Entstehen der Flecken verhindert, woraus sich wohl die allgemeine und ausschließliche Verwendung der genannten Flüssigkeit erklärt.

Die Behandlung der Felle weicht für sämischgares Leder von der für lohgares erheblich ab. Nach der Haarlockerung werden die Blößen auf chemischem Wege vorbereitet und mit einer Mischung, der sogenannten „Nahrung“ gegerbt, welche aus Alaun, Salz, Weizenkleie und Eidotter besteht. Diese „Nahrung“ nun bildet einen ausgezeichneten Nährboden für Pilze, besonders für ein in der Lederindustrie anscheinend allgemein vorkommendes Penicillium, das von uns als Penicillium solitum Westling bestimmt wurde. Zimmerwärme und die in den Blößen reichlich anwesende Feuchtigkeit begünstigen außerdem noch das Wachstum.

Nun haben weitere Versuche ergeben, daß Penicillium solitum imstande ist, größere Mengen Zitronensäure zu produzieren. Zum Nachweis dieser Säurebildung wird der Pilz auf Erlenmeyer-Kölbchen geimpft, welche mit Bierwürze-Agar und einer kleinen Menge kohlensaurem Kalk beschickt worden sind. Nach etwa 10 Tagen fängt der Kalk an sich zu lösen und bald darauf setzen sich zahlreiche Kristalle von Kalziumzitrat in Gestalt

weißer Klümpchen am Boden des Erlenmeyers ab, worin sich die Zitronensäure in der üblichen Weise mittels Denigès-Reagens leicht nachweisen läßt.

Diese Zitronensäure nun dringt von der ungefärbten Seite in das Leder ein und erreicht die Farbstoffschicht auf der anderen Seite. Die angegriffenen Stellen werden glanzlos, so daß die Anwesenheit der Säure sich in zahlreichen Flecken kund gibt. Es ist nun klar, worauf die empirisch gefundene Methode der Ammoniak-Behandlung beruht. Die Zitronensäure wird durch Ammoniak eben neutralisiert zu zitronensaurem Ammoniak, einem harmlosen Salz. Wird das Ammoniak zeitig angewandt, so ist es möglich, die Farbe vor der Zerstörung zu retten; die präventive Wirkung, welche von der Behandlung ausgeht, vermag weiter jede Säurebildung im Keime zu ersticken. Es wird aber auch jedem, der je mit Penicillium zu tun gehabt hat, einleuchten, daß dieser Pilz durch Ammoniak nicht abgetötet werden kann. Die Gefahr bleibt also bestehen, so lange die drei Anforderungen für das Wachstum desselben: Nährboden, Wärme und Feuchtigkeit, erfüllt sind. Diese Gefahr ist in feuchten Ländern wie Holland größer wie in Ländern, welche durchschnittlich eine geringere Luftfeuchtigkeit aufweisen. In Holland bedeutet denn auch die „Zeit der Kirschblüte" für die Lederindustrie eine Zeit erhöhter Gefahr. Im Sommer sind es die Gewitter, welche gefürchtet werden, besonders wenn die aufgestapelten Häute noch nicht ganz trocken sind. Zu erwähnen ist noch, daß trangegerbtes Leder fast niemals schimmelt. Dies wird wohl darauf zurückgeführt werden können, daß der Tran in das Leder eindringt und damit die Säure verhindert, die Farbschicht zu erreichen.

Auch in der Chromlederindustrie tritt mitunter Schimmelung auf und zwar in den Fällen, wo das chromgare Leder einige Zeit in feuchtem Zustande liegen bleibt. Die Untersuchung ergab, daß auch in diesen Fällen fast ausschließlich Penicillium solitum auftrat. Ebenso wurde dieses Penicillium von uns auf Stücken verschimmelten Schuhleders gefunden. Dagegen ergab die Untersuchung von 4 Mustern künstlicher Gerbextrakte, welche verschimmelt waren, in allen vier Fällen die ausschließliche Anwesenheit von Penicillium spinulosum Thom. Dieser Pilz scheint aber nicht weiter schädlich zu sein, auch wird er anscheinend nicht auf das Leder übertragen, so daß anzunehmen ist, daß er an bestimmte Substanzen, welche in den Extrakten vorkommen, gebunden ist.

Zusammenfassung.

Bei der Verarbeitung der feineren Lederarten ist Penicillium solitum Westling imstande, großen Schaden zu verursachen. Um diesem Schaden vorzubeugen, wird es nicht genügen, das Leder nur mit Ammoniak zu behandeln, da hierdurch zwar die Entstehung der Flecken gehemmt, der Pilz aber nicht getötet wird, so daß unter für den Pilz günstigen Umständen derselbe sich von neuem ausbreiten kann. Es ist daher erwünscht, das Leder außer mit Ammoniak auch noch mit irgendeiner, die Lederfarbstoffe nicht angreifenden fungiziden Substanz, wie solche zu diesem Zwecke schon im Handel erhältlich ist, zu behandeln, damit der Lederindustrie größerer Schaden durch Schimmelung erspart wird.

Nachdruck verboten.

Borsäure-Studien.

[Aus dem Gärungsphysiologischen Institut Weihenstephan der Technischen Hochschule Munchen.]

Von H. Schnegg und K. Weigand.

1. Allgemeiner Teil.

Vor einiger Zeit beobachtete einer unserer Mitarbeiter (Hofmayer-Pfullingen), daß auf Verdünnungsplatten, die von untergäriger Kulturhefe unter Zusatz von 1—2 ccm 3 proz. Borsäure angelegt waren, ausnahmslos rotgefärbte Hefekolonien entstanden. Keine einzige der Kolonien hatte das normale gelblich weiße Aussehen der Kulturhefekolonien. Merkwürdig war ferner, daß die abgeimpften roten Kolonien in Würze keine Gärung, wohl aber eine gute Vermehrung zeigten.

Zunächst glaubten wir, es mit einer Wirkung der Borsäure auf den Stoffwechsel der Hefe zu tun zu haben. Jedenfalls schien nach den Angaben der Literatur über den Einfluß chemischer Faktoren auf Hefe die Annahme nicht unberechtigt, daß die Borsäure die Hefe zur Farbstoffbildung anrege und gleichzeitig hemmend auf die Gärung einwirke.

Durch Untersuchungen von Kossowicz (1) ist festgestellt, daß Magnesium gewisse Heferassen zur Bildung roter Farbstoffe anregt. Außerdem liegen aus neuerer Zeit Beobachtungen von Fabian und Cullough (2) vor, die bei ihren Arbeiten über die Formenwandlungen bei Hefezellen unter dem Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auch gefärbte Formen erhielten: eine rote S-Form und eine schwarze R-Form von S. cerevisiae, ferner eine orangefarbene G-Form von Zygosaccharomyces mandschuricus.

Die eingehende Untersuchung der roten Hefekolonien sollte indessen bald Klarheit bringen. Eine mikroskopische Messung ergab zunächst, daß die roten Hefen in all ihren Dimensionen um ⅓—½ kleiner waren als die normale Kulturhefe. Eine Gärung war auch ohne Zusatz von Borsäure nicht zu erzielen. Ebenso behielt die rote Hefe Farbe, Form und physiologische Eigenschaften in borfreien Nährlösungen und auf festen Nährböden bei.

Aus all dem mußten wir den Schluß ziehen, daß es sich nicht um eine durch Borsäurebeeinflussung modifizierte Kulturhefe handeln konnte, sondern um einen Nicht-Saccharomyceten der Gattung Torula, was durch weitere Vergleiche mit den Torulastämmen aus der Organismensammlung des Instituts noch erhärtet wurde. Ferner stand damit fest, daß die Kulturhefe offenbar einer Giftwirkung der Borsäure zum Opfer gefallen und abgetötet worden war.

Es erhob sich nun die Frage nach dem Woher der Torula. Als Quelle konnte offensichtlich nur die verwendete Borsäurelösung in Frage kommen.

Zu den eben erwähnten Versuchen war ein in einer Apotheke gekauftes 3 proz. Borwasser, das bereits 1—2 Jahre im Laboratorium gestanden hatte, verwendet worden. Sofort angesetzte Blindproben (½, 1, 2 ccm Borwasser + 10 ccm Würzegelatine) ergaben das erwartete positive Resultat: Gefärbte Kolonien in beträchtlicher Anzahl, die sich

als identisch mit den von uns als Torula bestimmten Organismen der früheren Versuche erwiesen.

Als Gegenkontrolle wurde Borsäure in den Konzentrationen 1—3% in sterilem Wasser gelöst; die damit als Blindproben angelegten Plattenkulturen blieben auch nach wochenlangem Stehen steril. Selbst nach mehrmonatlicher Aufbewahrung der Lösungen waren in diesen bei erneuter Kontrolle mittels Blindproben keinerlei Organismen zu finden.

Anschließend an die genannten Beobachtungen wurde die Organismenflora der im Handel erhältlichen Borwässer einer systematischen Prüfung unterzogen. Aus verschiedenen Gegenden Deutschlands bezogen wir von Apotheken und Drogerien Borwässer, wie sie normaler Weise für die Zwecke der Augenbehandlung u. dergl. verwendet werden. Im ganzen wurden 11 verschiedene Firmen berücksichtigt, wie aus Tab. 1 hervorgeht. Soweit als möglich wurden auch Borwässer verschieden langer Aufbewahrungsdauer in den Kreis der Untersuchungen einbezogen, um den Einfluß des Alters auf Zahl und Art der Organismen näher zu ergründen.

Für gewöhnlich bezogen wir die Borwässer in Originalabfüllungen der betreffenden Apotheken und Drogerien. In denjenigen Fällen, in denen wir in eigenen Flaschen das Borwasser besorgten, wurden die Flaschen, um etwaige Infektionen durch diese selbst auszuschalten, vorher im Institut sterilisiert.

Die durch Titration als Mannitborsäure bestimmten Prozentgehalte der verschiedenen Borwässer schwankten nur zwischen 2,72% und 3,35%, so daß eine gute Vergleichsbasis besteht.

Die Versuchsanordnung gestaltete sich sehr einfach: Zu 10 ccm Würzegelatine wurden je ½, 1 und 2 ccm der zu prüfenden Borwässer gegeben und damit Plattenkulturen angelegt. Nach 4—5 Tagen erfolgte die Auszählung der Kolonien, nach 9—10 Tagen eine zweite zahlenmäßige Kontrolle auf eventuell später erschienene Kolonien. Die Zahlen in der Tab. 1 geben die Anzahl der Kolonien in 1 ccm Borwasser an. Die Resultate des niedrigeren (½ ccm) und höheren (2 ccm) Borwasserzusatzes stimmten damit gut überein und dienten hauptsächlich als Kontrolle. Auf ihre Aufnahme in die Tabelle wurde daher verzichtet.

Die Organismenarten waren mit Ausnahme von Versuch 7a und 7b immer die gleichen, ebenso in der Regel die Organismenzahlen gut übereinstimmend. Nur die Versuche 9a und 9b zeigten in dieser Hinsicht starke Abweichungen voneinander. Eine Trübung der Borwässer durch die suspendierten Organismen war in keinem Fall, auch bei den mehrere Jahre alten Proben nicht, zu bemerken.

Die Ergebnisse der Prüfung sind kurz zusammengefaßt folgende:

1. Kein einziges der bezogenen Borwässer war keimfrei.

2. Es wurden drei Gattungen von Organismen festgestellt: rote Torula in zwei verschiedenen Farbtönen (blaßrot und tiefrot), sogenannte „schwarze Hefen“ und zahlenmäßig weit geringer, Kolonien des Schleimschimmels Dematium pullulans. Über eine Ausnahme, das Vorkommen von Penicillium (Borwasser Nr. 7a), wird noch zu sprechen sein.

3. Borwässer, die ein Jahr und länger aufbewahrt worden waren, zeigten geringere Organismenzahlen als die frisch bezogenen.

Tabelle 1.

Borwasser Nr.	%-Gehalt an Borsaure	Alter	Zahl der gef. Organismen	Art der gefundenen Organismen	Bemerkungen
1 a	3,35	1 Jahr	448	65 Torula blaßrot 383 Schwarze Hefen	Apotheke
1 b	3,33	frisch	5 180	Torula tief- und blaßrot	Apotheke
2 a	3,20	3 Jahre	75	Torula rot	Apotheke
2 b	3,20	1 Jahr	237	53 Torula rot 184 Schwarze Hefen	Apotheke
2 c	3,06	frisch	8 300	5 100 Torula rot 3 200 Schwarze Hefen	Apotheke
3 a	3,10	1 Jahr	157	45 Torula blaßrot 112 Dematium	Drogerie
3 b	3,02	frisch	1 291	369 Torula blaßrot 800 Schwarze Hefen 122 Dematium	Drogerie
4	2,96	frisch	444	65 Torula blaßrot 192 Schwarze Hefen 187 Dematium	Drogerie
5	2,72	frisch	899	199 Torula rot 700 Dematium	Drogerie
6	2,90	frisch	39 500	10 500 Torula rot 29 000 Schwarze Hefen	Apotheke
7 a	2,97	frisch	4 120	3 950 Torula rot 170 Penicillium	Apotheke Originalabfü.
7 b	2,97	frisch	18 700	Torula rot	Apotheke Eig. steri. Fl.
8	3,07	frisch	43 000	Torula rot	Apotheke
9 a	2,87	frisch	56 800	38 400 Torula rot 18 400 Schwarze Hefen	Apotheke Originalabfu.
9 b	2,87	frisch	20 100	15 000 Torula rot 5 100 Schwarze Hefen	Apotheke Eig. steri. F.
10	3,46	frisch	1 614	1 600 Torula rot 14 Dematium	Apotheke
11	3,14	frisch	1 731	1 650 Torula rot 81 Schwarze Hefen	Apotheke

4. Trotz der räumlich weit auseinanderliegenden Herkunftsorte ist die nachgewiesene Organismenflora durchaus gleichartig. Dematium, das nur in einer einzigen Apothekenprobe gefunden wurde, scheint Drogerien zu bevorzugen.

Hierzu ist zu bemerken: Bei den in den Borwässern überaus häufig vorkommenden „schwarzen Hefen" handelt es sich um einen Organismus, der im allgemeinen recht selten auftritt und dessen Stellung im Pilzsystem noch umstritten ist. Es bedeutete auch für uns eine ziemliche Überraschung, den genannten Organismus in derartiger Menge und Regelmäßigkeit anzutreffen. Ihre Kolonien erscheinen später als die der Torulaceen auf den Platten und wurden in der Regel erst bei der zweiten Zählung erfaßt. Eine zusammenfassende Darstellung der Kenntnisse über „schwarze Hefen" hat Will (3) auf Grund eigener Beobachtungen und unter Berücksichtigung der einschlägigen Literatur gegeben, Befunde, die wir bei dieser Gelegenheit vollkommen bestätigen konnten.

Recht auffällig ist das Vorkommen von Penicillium in Versuch 7 a, das bei wiederholten Kontrollversuchen immer wieder festzustellen war. Wahrscheinlich stammt das Penicillium aus der Flasche oder dem Kork

der Originalabfüllung, da es in dem Borwasser, das in eigener steriler Flasche aus der gleichen Apotheke bezogen wurde, nicht aufzufinden war. Ungeklärt bleibt dagegen die Tatsache, daß es sich überhaupt lebensfähig erhalten konnte, was den bisherigen Erfahrungen, ebenso unseren eigenen Feststellungen widerspricht (s. u.).

Am unempfindlichsten gegen den schädigenden Einfluß der Borsäure sind offensichtlich die roten Torulaarten; eine blaßrote Form bleibt noch nach drei Jahren, die tiefrot gefärbte Form noch nach einem Jahr lebensfähig. Die schwarzen Hefen und Dematium bleiben ebenfalls über 1 Jahr hindurch am Leben.

Interessante Anhaltspunkte für unsere Beobachtungen ergaben sich bei der Durchsicht der Literatur über die Einwirkung der Borsäure auf niedere pflanzliche Organismen. Unmittelbar mit unseren Befunden in Beziehung steht eine Arbeit von E. Wirth (4), der aus zwei trübgewordenen Borwasserproben (3 proz., aus Apotheke stammend) als Ursache der Trübung rot und rosa gefärbte Torulaarten feststellte und isolierte. Wirth prüfte ferner eine Reihe von Hefen und Bakterien auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Borsäure, die sich sämtlich als verhältnismäßig stark empfindlich gegen deren Einwirkung erwiesen. Sie waren nach sechswöchigem Verweilen in 1—4 proz. Borsäurelösungen abgetötet. Über den genauen Zeitpunkt des Eintretens der Schädigung ist nichts gesagt. Als Infektionsquelle der Borwässer aus den Apotheken macht Wirth die Luft verantwortlich. Er isolierte rote und rosa Torula aus Luftanalysen, brachte sie in Borsäure und beobachtete das Auftreten einer starken Trübung infolge der Vermehrung der eingeimpften Zellen. Zwecks Vermeidung der Infektionen empfiehlt Wirth die Verwendung frisch destillierten Wassers, Sterilisation der Vorratsflaschen sowie besondere Vorsichtsmaßregeln beim Entnehmen der Borsäure aus den Flaschen. Leider enthält die Arbeit keine zahlenmäßigen Angaben, auch über das Alter der zwei Proben findet sich nichts. Es dürfte sich unserer Ansicht nach um besonders krasse Fälle handeln, wie schon aus dem Trübwerden des Borwassers hervorgeht, das wir auch nach langem Stehen nicht in bemerkenswertem Grade feststellen konnten. Über andere noch vorkommende Organismen ist nichts erwähnt. Vielleicht war auch die Beobachtungsdauer der Plattenkulturen zu kurz, so daß etwa vorhanden gewesene „schwarze Hefen“, von denen wir festgestellt haben, daß sie erst verhältnismäßig spät nach dem Auftreten der Torulaceen in die Erscheinung treten, sich möglicherweise der Feststellung entzogen haben. Auch durch die Überzahl der Torulaceen konnte das Aufkommen anderer Organismen verhindert worden sein.

J. Boeseken und H. I. Watermann (5) haben unter anderem die Wirkung der Borsäure auf die Entwicklung von Penicillium glaucum und Aspergillus niger verfolgt und kommen zu dem Ergebnis, daß eine hemmende Wirkung der Borsäure dann verhindert wird, wenn sie im Nährmedium durch organische Stoffe gebunden wird (z. B. Mannit, Lävulose, Sorbit, Dulcit). Penicillium hat sich dabei als sehr empfindlich gegen Borsäure erwiesen, weniger Aspergillus niger. Wie schon erwähnt, steht diese Beobachtung in Widerspruch zu den Beobachtungen an dem Borwasser 7 a.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt Voicu (6), der beobachtete, daß

die Giftwirkung von Borsäure auf Micrococcus ureae und Mycoderma durch Glukose stark vermindert wird.

Forster (7) stellte fest, daß sich Paratyphus- und Enteritisbakterien noch in Lösungen vermehren, die 0,5% freie Borsäure enthalten; sie bleiben lebensfähig bis zu 4% Borsäure. Ein sehr interessanter Befund im Hinblick auf die Verwendung von Borsäure als Konservierungsmittel.

Ebenso spricht Lansberg (8) der Borsäure eine bakterizide Wirkung ab.

Die mangelhafte Desinfektionswirkung der Borsäure wird ferner belegt durch eine Anzahl in Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, zitierter Arbeiten älteren Datums.

2. Experimenteller Teil.

Auf Grund der vorstehenden Beobachtungen und der verschiedenen Literaturangaben unternahmen wir eine systematische Untersuchung der Borsäurewirkung auf eine Reihe von Organismen (s. Tab. 2). Dazu wurden außer den aus Borwässern isolierten Organismen ausschließlich Reinzuchten der geprüften Organismen aus der Organismensammlung des Instituts verwendet.

Es wurden 4 Borsäurelösungen in den Konzentrationen 1,1%, 2,1%, 3,1% und 4,1% hergestellt, in Kölbchen von je 10 ccm abgefüllt und fraktioniert sterilisiert. Die zu prüfenden Organismen wurden in sterilem Wasser aufgeschlämmt und von der Aufschlämmung je 1 ccm in die 4 Borsäurekölbchen steril einpipettiert, so daß die auf die Organismen wirksamen Borsäurekonzentrationen nun genau 1%, 2%, 3% und 4% waren. 4 proz. Borwasser ist bei Zimmertemperatur nahezu gesättigt, die Herstellung höherer Konzentrationen erübrigte sich somit.

Als Blindversuch und um zu ermitteln, wie möglicherweise schon längeres Verweilen der Organismen in Wasser auf diese sich auswirkt, wurde auch 1 ccm jeder Organismenaufschlämmung in ein Kölbchen mit 10 ccm Wasser gebracht und damit im übrigen genau so verfahren, wie mit den Borsäurekulturen. Letztere diente zugleich zur Feststellung der Zahl der eingeimpften Organismen. Zu diesem Zweck wurde 1 ccm des beimpften Kölbchens in 10 ccm Würzegelatine gegeben und damit eine Plattenkultur angelegt. Auf gleiche Weise erfolgte die zahlenmäßige Prüfung der unter Borsäurewirkung gestandenen Organismen.

In der Regel erwies es sich als genügend, die erste Kontrolle auf die Einwirkung 24 Std. nach dem Einimpfen der Organismen vorzunehmen. In Zweifelsfällen wurden sämtliche Kölbchen sofort nach dem Beimpfen geprüft; eine momentane Desinfektionswirkung der Borsäure konnte somit noch erfaßt werden, die Einwirkungsdauer betrug 15 Min. (s. Tab. 3). Zur Prüfung der Dauerwirkung der Borsäure wurden außerdem Kontrollen noch nach 1-, 2- und 4 wöchigem Stehen der Versuchskölbchen vorgenommen.

Um eine sichere zahlenmäßige Feststellung auch bei größerer Organismeneinsaat zu gewährleisten, wurden bei der Kontrolle außer mit 1 ccm Plattenkulturen auch mit 10 und 100 fachen Verdünnungen in sterilem Wasser angelegt. Die Zahlen in den Tabellen geben in diesen Fällen die auf 1 ccm der Originaleinimpfung umgerechneten Organismenzahlen an.

Um eine Verdunstung und damit eine Konzentrationserhöhung der Lösung bei mehrwöchigem Stehen zu verhindern, wurden die Watteverschlüsse

Tabelle 2.

Nr.	Geprufte Organismen	Zahl der eingeimpften Organismen (Versuchsbeginn)	Organismenzahl nach 1 Tag Aufenthalt in				
			H_2O Kontrolle	Borsäure			
				1%	2%	3%	4%
1	Kulturhefe	45 900	28 900	4 170	6 500	2	—
2	Sacch. ellipsoideus .	62 300	35 100	30 600	40 100	14 200	—
3	Mycoderma	14 200	14 300	—	—	—	—
4	Torula blaßrot . .	16 900	11 900	13 100	4 300	1 010	820
5	Torula tiefrot . . .	39 800	6 800	12 480	690	790	365
6	Torula 12 weiß . .	11 700	20 600	7 400	450	220	—
7	Torula 42 rot . . .	8 500	820	570	25	4	—
8	Torula 51 rot . . .	6 800	420	790	9	—	—
9	Monilia candida . .	22 700	19 280	13 040	3 170	1	—
10	Pseudomonilia . .	2 520	490	690	83	—	—
11	Schwarze Hefe . .	9 100	30 500	6 800	2 030	890	550
12	Penicillium glaucum	2 550	2 520	360	—	—	—
13	Mucor racemosus .	++++	++++	+++	++	+	±
14	Oidium lactis . . .	++++	++++	470	395	256	—
15	Dematium pullulans	2 900	13 600	3 130	180	2	—
16	Essigbakterien . .	10 100	280	—	—	—	—
17	Termobakterien . .	∞	102 000	27 800	85 000	26	—
18	Milchs.-Bakt. St. I .	∞	∞	∞	∞	∞	∞
19	Milchs.-Bakt. St. II	9 100	—	—	—	—	—
			Organismenzahl nach 8 Tagen Aufenthalt				
1	Kulturhefe	45 900	26 700	22	—	—	—
2	Sacch. ellipsoideus .	62 300	100 000	69	125	1	—
3	Mycoderma	14 200	130 000	—	—	—	—
4	Torula blaßrot . .	16 900	∞	∞	∞	∞	83 000
5	Torula tiefrot . . .	39 800	51 000	4 600	∞	∞	48 500
6	Torula 12 weiß . .	11 700	∞	460	—	—	—
7	Torula 42 rot . . .	8 500	62	—	—	—	—
8	Torula 51 rot . . .	6 800	11	—	—	—	—
9	Monilia candida . .	22 700	∞	1 260	—	—	—
10	Pseudomonilia . .	2 520	2 650	145	—	—	—
11	Schwarze Hefe . .	9 100	∞	∞	8 500	160	· 10
12	Penicillium glaucum	2 550	305	25	—	—	—
13	Mucor racemosus .	++++	++++	+++	+	±	±
14	Oidium lactis . . .	++++	4 300	390	111	—	—
15	Dematium pullulans	2 900	2 300	700	—	—	—
16	Essigbakterien . .	10 100	—	—	—	—	—
17	Termobakterien . .	∞	∞	14 200	86	—	—
18	Milchs.-Bakt. St. I .	∞	∞	∞	∞	11 300	15
19	Milchs.-Bakt. St. II	9 100	—	—	—	—	—

sämtlicher Kölbchen mit Stanniol umhüllt, das mit Gummischnürchen fest an den Hals der Kölbchen gepreßt wurde.

Zu den Tab. 2 und 3 ist zu bemerken, daß eine Abnahme der Keimzahlen immer auch mit einem verspäteten Erscheinen der Organismen auf

Tabelle 2 (Fortsetzung).

Nr.	Geprüfte Organismen	Zahl der eingeimpften Organismen (Versuchsbeginn)	Organismenzahl nach 15 Tagen Aufenthalt in				
			H_2O Kontrolle	Borsäure			
				1%	2%	3%	4%
1	Kulturhefe	45 900	21 500	—	—	—	—
2	Sacch. ellipsoideus .	62 300	∞	—	—	—	—
3	Mycoderma	14 200	∞	—	—	—	—
4	Torula blaßrot . .	16 900	∞	∞	∞	∞	89 000
5	Torula tiefrot . . .	39 800	53 000	4 900	∞	∞	100 000
6	Torula 12 weiß . .	11 700	∞	5	—	—	—
7	Torula 42 rot . . .	8 500	125	—	—	—	—
8	Torula 51 rot . . .	6 800	—	—	—	—	—
9	Monilia candida . .	22 700	∞	295	—	—	—
10	Pseudomonilia . .	2 520	2 770	1	—	—	—
11	Schwarze Hefe . .	9 100	∞	∞	∞	18	—
12	Penicillium glaucum	2 550	750	11	—	—	—
13	Mucor racemosus. .	++++	++++	++	±	±	—
14	Oidium lactis . . .	++++	2 800	180	—	—	—
15	Dematium pullulans	2 900	5 000	47	—	—	—
16	Essigbakterien . .	10 100	—	—	—	—	—
17	Termobakterien . .	∞	∞	3 800	—	—	—
18	Milchs.-Bakt. St. I .	∞	∞	60 000	11 100	—	—
19	Milchs.-Bakt. St. II	9 100	—	—	—	—	—
			Organismenzahl nach 29 Tagen Aufenthalt				
1	Kulturhefe	45 900	10 900	—	—	—	—
2	Sacch. ellipsoideus .	62 300	∞	—	—	—	—
3	Mycoderma	14 200	∞	—	—	—	—
4	Torula blaßrot . .	16 900	157 500	44 000	38 000	22 000	116 500
5	Torula tiefrot . . .	39 800	9 800	271 000	287 000	237 000	99 000
6	Torula 12 weiß . .	11 700	∞	—	—	—	—
7	Torula 42 rot . . .	8 500	—	—	—	—	—
8	Torula 51 rot . . .	6 800	—	—	—	—	—
9	Monilia candida . .	22 700	∞	2	—	—	—
10	Pseudomonilia . .	2 520	1 750	—	—	—	—
11.	Schwarze Hefe . .	9 100	2 000 000	1 230 000	1 810 000	1 140 000	—
12	Penicillium glaucum	2 550	850	—	—	—	—
13	Mucor racemosus .	++++	—	—	—	—	—
14	Oidium lactis . . .	++++	2 600	35	—	—	—
15	Dematium pullulans	2 900	20 000	12 600	8 500	—	—
16	Essigbakterien . .	10 100	—	—	—	—	—
17	Termobakterien . .	∞	∞	—	—	—	—
18	Milchs.-Bakt. St. I .	∞	18 200	20 400	—	—	—
19	Milchs.-Bakt. St. II	9 100	—	—	—	—	—

der Platte einhergeht, also eine Wachstumshemmung neben der Desinfektionswirkung deutlich festzustellen ist.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Organismengruppe: Echte Hefen (Saccharomyceten).

a) Die gewöhnliche untergärige Brauereihefe Nr. 1 erweist sich als sehr wenig widerstandsfähig gegen die Wirkung der Borsäure. Bereits nach 24 Std. ist eine deutliche Abnahme der Keimzahlen schon in 1 proz. und 2 proz. Lösung zu verzeichnen. In der 3 proz. Lösung sind sogar nur wenige Zellen noch am Leben geblieben, während die 4 proz. Lösung absolut keimtötend wirkt. Nach 8 tägiger Einwirkung ist die Abtötung nahezu vollkommen, nur in der 1 proz. Lösung sind auch nach dieser Zeit noch einige Zellen am Leben geblieben. Längere Einwirkungsdauer hält die Hefe nicht mehr aus.

b) Saccharomyces ellipsoideus besitzt etwas größere Widerstandsfähigkeit. Die Hefe kann sich in 1 proz. und 2 proz. Lösung immerhin 8 Tage am Leben erhalten. Höhere Konzentrationen und eine längere Einwirkungsdauer hält allerdings auch diese Hefe nicht aus.

Daß die Ellipsoideushefe sich gegen Borsäure widerstandsfähiger erweist als die Kulturhefe, entspricht den Erfahrungen über die größere Widerstandsfähigkeit dieser Hefe auch anderen keimtötenden Mitteln gegenüber, insbesondere auch gegen Weinsäuresaccharoselösung, wie sie zum Nachweis wilder Hefen in Brauereilaboratorien verwendet zu werden pflegt, um sie von der Kulturhefe zu trennen. Kulturhefe wird davon in 24 Std. abgetötet, während wilde Hefen (Sacch. ellipsoideus, Sacch. pastorianus u. a.) die Behandlung ohne Einbuße ihrer Lebensfähigkeit überdauern.

Auffallend ist die starke Zunahme der Zellenzahlen in den Kontrollkulturen in Wasser, wie sie übrigens auch bei anderen Organismen im Rahmen dieser Versuche festgestellt wurde. Anscheinend bilden die nach einer anfänglichen Abnahme der Keimzahl entstandenen Autolysationsprodukte eine genügende Nährstoffquelle, um nicht nur die Hefe am Leben zu erhalten, sondern auch eine weitere Vermehrung zu ermöglichen.

2. Organismengruppe: Unechte Hefen (Pseudosaccharomyceten).

a) Die Kahmhefe Mycoderma erweist sich als außerordentlich empfindlich gegen die Borsäure. Sie wird bereits innerhalb 24 Std. schon von der 1 proz. Lösung abgetötet.

b) Sehr interessant sind die Ergebnisse mit den Torulaarten Nr. 4—8, namentlich der Vergleich der verschiedenen Stämme untereinander. Die geprüften Stämme Nr. 4 und 5 sind aus käuflichen Borlösungen (1 Jahr alt) reingezüchtet worden, während die Stämme Nr. 6—8 der Organismensammlung des Instituts entnommen sind.

Erwartungsgemäß zeigt sich bei den Borsäurestämmen eine außerordentlich große Widerstandsfähigkeit gegenüber der Borsäure auch noch in 4 proz. Lösung. Merkwürdigerweise erfolgt allerdings innerhalb der ersten 24 Std. in Borsäure ein verhältnismäßig starker Abfall der Zellenzahlen verglichen mit der wässerigen Kontrollkultur, um aber dann im Laufe einer Woche enorm anzusteigen. Wahrscheinlich werden zunächst alle weniger lebenskräftigen Zellen kurz nach dem Einimpfen abgetötet oder doch sehr stark in ihren Lebensäußerungen gehemmt. Die anpassungsfähigen Zellen dagegen be-

ginnen vielleicht auch unter dem Einfluß der aus den toten Zellen gebildeten Autolysationsprodukte bald mit einer kräftigen Vermehrung und bewirken so das sprunghafte Ansteigen der später ermittelten Zahlen. Nach 15 Tagen ist der Höhepunkt der Vermehrungsfähigkeit offenbar erreicht, denn später beginnen die Keimzahlen wieder langsam abzunehmen. Sie liegen aber selbst in der 4 proz. Borlösung nach 4 wöchiger Einwirkung noch zwischen 99 000—116 500 je 1 ccm. Dieses Absinken der Vermehrungskurve kann sich unter Umständen über einen jahrelangen Zeitraum hinziehen, wie die Prüfung der alten Borwässer ergeben hat (s. Tab. 1, Nr. 1a, 2a und 3a). Nennenswerte Unterschiede zeigen die beiden Borsäurestämme untereinander nicht.

Ganz anders dagegen verhalten sich die Stämme Nr. 6, 7 und 8 aus der Institutssammlung. Der Wahl gerade dieser Stämme liegt folgende Überlegung zugrunde:

T 12 ein weißer Torulastamm wurde deshalb gewählt, um einen etwaigen Zusammenhang der Borsäurefestigkeit mit der Farbstoffbildung zu erklären, teils deshalb, weil er in seinem Verhalten in Kultur den roten Borsäurestämmen durch Fehlen der bei Torulaceen häufig vorkommenden Schleimbildung am nächsten zu stehen schien. Die beiden anderen Arten T 42 und T 51 sind rote Stämme aber von den Borsäurestämmen durch ihr Schleimbildungsvermögen verschieden. T. 42 besitzt nur geringe Neigung zur Schleimbildung, T 51 dagegen bildet viel Schleim, so daß dieser Stamm in Flüssigkeitskultur stark fadenziehend wird.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ändern sich die Verhältnisse bei den 3 Laboratoriumsstämmen nicht nur unter sich, sondern auch verglichen mit den Borsäurestämmen grundlegend. Verschieden ist schon das Verhalten in den Kontrollkulturen in Wasser. Der weiße Stamm T 12 gleicht als nicht schleimbildende Art den Borsäurestämmen in dieser Hinsicht insofern, als er sich in Wasser ebenfalls noch bedeutend vermehrt. Bei den beiden schleimbildenden roten Stämmen T 42 und T 51 dagegen ist schon die Lebensfähigkeit in der wässerigen Aufschlämmung sehr gering, so daß T 51 schon nach 2 Wochen, T 42 nach 4 Wochen im Wasser vollständig abgestorben ist.

Auch die Widerstandsfähigkeit der eigenen Torulastämme gegen die Borlösung ist außerordentlich gering. Während der weiße Stamm T 12 den Borsäurestämmen noch insofern sich nähert, als nach 24 stünd. Einwirkung bis zu 3 proz. Stärke noch eine ziemliche Lebensfähigkeit bestehen bleibt, nimmt die Zahl der lebenden Zellen bei den schleimbildenden Stämmen T 42 und T 51 sehr rasch ab und erreicht innerhalb 24 Std. bei T 51 schon in der 3 proz., bei T 42 in der 4 proz. Borlösung ihr Ende. Längere Einwirkung der 1 proz. Lösung hält nur der weiße Stamm T 12 noch bis zu 15 Tagen aus, die beiden schleimbildenden roten Stämme T 42 und T 51 dagegen sterben schon innerhalb der ersten 8 Tage bereits in der 1 proz. Lösung ab.

Über die momentane Wirkung der Borlösung auf die beiden Torulastämme T 42 und T 51 nach der 15 Min. langen Einwirkung gibt Tab. 3 Aufschluß.

Welches die Gründe für dieses auffallend abweichende Verhalten der Laboratoriumsstämme gegenüber den Borsäurestämmen sind, läßt sich mit Sicherheit wohl nicht entscheiden. Immerhin scheint die Tatsache, daß nur die nicht schleimbildenden Arten sich im Wasser noch stark vermehren, die schleimbildenden aber mit der Länge der Wassereinwirkung eher absterben, auch für die größere Widerstandsfähigkeit der ersteren in Borlösungen zu sprechen. Daß die Borsäurearten noch widerstandsfähiger sind,

Tabelle 3.

Nr.	Geprüfte Organismen	Organismenzahl nach 15 Min. langer Einwirkung in H_2O Kontrolle	Borsäure 1%	2%	3%	4%
7	Torula 42 rot	8 500	5100	1750	850	200
8	Torula 51 rot	6 800	5200	3950	1150	255
13	Mucor racemosus	++++	+++	++	+	±
16	Essigbakterien	10 100	—	—	—	—
19	Milchsäurebakterien St. II	9 100	7950	8000	7650	6800

als die weiße Torula T 12 dürfte wohl mit der langen Anpassung der ersteren an den Aufenthalt in Borsäure im Zusammenhang stehen. Die Laboratoriumsstämme haben aber vermutlich durch die lange Kultur unter künstlichen Verhältnissen (Aufbewahrung auf Agar oder in Saccharoselösung) eine Schwächung ihrer Widerstandsfähigkeit gegen schädigende Einflüsse erlitten.

Man könnte versucht sein, die auffallend geringe Widerstandsfähigkeit der schleimbildenden Stämme gegen Borsäure auch damit zu erklären, daß der Schleim die Borsäure adsorbiert und deren Wirkung auf die Zellen dadurch verstärkt. Wenn man allerdings bedenkt, daß diese Stämme auch in Wasser schon nach längerem Verweilen absterben und anderseits das ebenfalls schleimbildende Dematium (s. u.) eine verhältnismäßig große Widerstandsfähigkeit aufweist, scheint ihr abweichendes Verhalten in der Hauptsache doch artmäßig begründet zu sein.

Jedenfalls steht fest, daß in Borsäurelösungen offenbar nur Torulastämme sich halten können, die über ein gewisses Maß von Anpassungsfähigkeit verfügen.

Daß die Borwirkung tiefergreifenden Einfluß auf die Physiologie eines Organismus haben kann, wurde bezüglich der Farbstoffbildung an T 51 beobachtet. Verdünnungsplatten mit 10 ccm Würzegelatine unter Zusatz von 1 ccm 1 proz. Borsäure (Borsäuregehalt in der Platte also rund 0,1%) ließen feststellen, daß zwar eine bemerkbare Wachstumshemmung verglichen mit den borsäurefreien Kontrollplatten bei dieser Dosierung nicht eintrat, daß dagegen die Farbe der Kolonien unter Borsäureeinfluß deutlich blässer war, als die der tiefroten Kontrollkolonien ohne Borsäurezusatz.

c) Die beiden, in der neueren Systematik auch zu den Pseudosaccharomyceten gerechneten Pilze Monilia und Pseudomonilia zeigen keine nennenswerten Unterschiede. Während sich Monilia in Wasser weiter stark vermehrt, bleiben bei Pseudomonilia die Zellenzahlen ziemlich konstant. Damit in einem gewissen Zusammenhang zeigt Monilia auch etwas größere Widerstandsfähigkeit gegenüber Borlösungen. Beide Organismen halten zwar die ersten 24 Std. der Einwirkung der 1- und 2 proz. Borsäure noch stand, aber schon nach 1—2 Wochen halten nur mehr wenige Zellen die Einwirkung der 1 proz. Lösung noch aus.

d) Die aus einem 1 Jahr alten Borwasser isolierte „schwarze Hefe" steht in ihrem Verhalten, wie auch das häufige Vorkommen in den käuflichen Borwässern nicht anders erwarten ließ, den Borsäurestämmen der Torula sehr nahe. Typisch ist vor allem für diesen Organismus nicht nur die große Vermehrungsfähigkeit in wässeriger Aufschlämmung auch noch nach 4 wöch. Verweilen in Wasser, sondern ganz besonders die große Wider-

standsfähigkeit gegen Borlösungen bis zu 3%. Wie die Versuche gezeigt haben, erfolgt sogar in den Borlösungen noch eine weitere Vermehrung der Hefen, die auch deren Vorkommen noch in Jahre alten Borwässern erklärt. Erst die Erhöhung der Konzentration der Borlösung auf 4% bedingt auch bei diesem Organismus eine deutliche Hemmung der Entwicklung bei kürzerer und schließlich eine Abtötung bei längerer Einwirkungsdauer.

3. Organismengruppe: Schimmelpilze.

a) Von den geprüften 4 Schimmelpilzen erweist sich Penicillium dessen Konidien auch in Wasser nicht besonders lebensfähig blieben, als ziemlich empfindlich gegen die Borsäure bereits in 1 proz. Lösung. Schon nach 2 Wochen langer Behandlung nimmt die Zahl der lebensfähigen Konidien sehr stark ab, um nach längerer Behandlung schließlich zur Vernichtung des Pilzes zu führen. Es bestätigen sich also damit die Angaben von J. Boeseken und H. I. Watermann (5). Widerspruchsvoll bleibt nach wie vor der Befund in Borwasser 7 a (Tab. 1).

b) Bei den beiden Pilzen Mucor racemosus und Oidium lactis ließ sich die Wirkungsweise der Borsäure wegen der schon gleich bei der Keimung der Sporen bzw. Konidien sich einstellenden starken Myzelentwicklung vor allem bei den kurzen Einwirkungszeiten zahlenmäßig nicht erfassen. Nur bei Oidium war es mit Abnahme der Keimzahlen schließlich möglich, den bisher bei den anderen Organismen beschriebenen Weg einzuhalten. Es wurde daher versucht, die Hemmungswirkung der Borsäure graduell zu verfolgen in der Weise, daß die Dichte und Stärke der Überwucherung der Platte und die Art der Sporangienentwicklung bei Mucor als Maßstab für deren Beurteilung zugrunde gelegt wurden. Es bedeuten (s. Tab. 2 und 3):

++++ Normales Wachstum, Platten nach 3 Tagen stark überwuchert, Sporangienbildung normal.

+++ Wachstum etwas schwächer, Myzel weniger dicht, Sporangienbildung normal.

++ Kolonien beginnen verspätet zu wachsen, erst nach 3 Tagen Myzelrasen, jedoch niedriger; Sporangien in geringerer Zahl und kleiner.

+ Nach 3 Tagen erste Anzeichen eines Wachstums, Myzelrasen bleibt sehr niedrig; Sporangien in geringer Zahl, durchwegs verkümmert und zwerghaft.

± Nach 4 Tagen erste Anzeichen eines Wachstums, Myzelrasen sehr niedrig, Zwergsporangien, alle Anzeichen starker Verkümmerung.

— Kein Wachstum innerhalb der Beobachtungszeit (bis zu 3 Wochen). Bemerkenswert ist das spontane Eintreten der Schädigung schon nach 15 Minuten.

Verglichen mit Penicillium zeigt Mucor eine größere Widerstandsfähigkeit gegen Borsäure. Nach 8 täg. Einwirkung tritt sogar in 4 proz. Lösung noch schwache Entwicklung ein, die bei 2 wöch. Behandlung auch in der 3 proz. Lösung noch festzustellen ist. Bei längerer Einwirkungsdauer wirkt auch die 1 proz. Lösung bereits keimtötend.

Oidium lactis erweist sich in Übereinstimmung mit dessen Widerstandsfähigkeit auch gegenüber anderen chemischen Einflüssen den Borsäurelösungen gegenüber ebenfalls als ziemlich unempfindlich. Bei 24 stünd. Behandlung entwickelt es sich noch in 3 proz., nach 8 täg. Einwirkung der Borsäure noch in 2 proz. Lösung; und unter entsprechender Verminderung der lebensfähigen Zellen hält es sogar 4 wöch. Aufenthalt in der 1 proz. Borlösung noch aus.

c) Eine Sonderstellung in der Gruppe der geprüften Schimmelpilze nimmt der Schleimschimmel Dematium pullulans ein, die im wesentlichen im Einklang steht mit der Tatsache, daß dieser Organismus ebenfalls in käuflichen Borwässern gefunden wird (s. Tab. 1, Nr. 3a, 3b, 4, 5 und 10). Zu den Versuchen wurde ein Stamm unserer Organismensammlung verwendet. Es ist möglich, daß das aus Borwasser isolierte Dematium vielleicht eine noch größere Widerstandsfähigkeit aufweist, wie sein Vorkommen auch noch in einer 1 Jahre alten Probe (Nr. 3a) zu beweisen scheint.

Mit seiner Eigenschaft, sich in Wasser und Borsäure weiter zu vermehren, die bei anderen Organismen (Torula, schwarze Hefe), bereits beobachtet wurde, kommt er diesen Pilzen in seiner Widerstandsfähigkeit gegen die Einwirkung der Borsäure nahe. Er vermag jedenfalls Borsäurekonzentrationen von 1—2% auch nach 4wöch. Einwirkung noch gut zu ertragen.

4. Organismengruppe: Bakterien.

Wenn auch Bakterien nach den von uns angewandten Methoden, wie sie für die Feststellung von Gärungsorganismen üblich sind, in den käuflichen Borwässern nicht gefunden wurden, so läßt sich doch über ein etwaiges Vorkommen von pathogenen Bakterien darin nichts aussagen. Wahrscheinlich ist es nicht, immerhin besteht nach den Befunden von Forster (7) die Möglichkeit, daß auch pathogene Bakterien in Borsäurelösungen sich lebend erhalten können.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden aus der Institutssammlung verwendet: Essigsäurebakterien, Termobakterien und 2 Stämme von Milchsäurebakterien, Stamm 1, verhältnismäßig kurzzellig und langsam wachsend und Stamm 2 ausgesprochen langzellig und ziemlich raschwüchsig.

a) Am empfindlichsten gegen Borsäure erweisen sich die Essigsäurebakterien, die schon von 1 proz. Lösung sofort abgetötet wurden (Tab. 3). Sie zeigen in dieser Hinsicht Übereinstimmung mit den ihnen hinsichtlich ihres aeroben Charakters nahestehenden Kahmhefen (Mycoderma) (s. o.). Auch in Wasser leben diese Bakterien nicht länger als 24 Std.

b) Die Termobakterien, wichtige Vertreter der Gruppe der Fäulnisbakterien, zeigen dagegen eine verhältnismäßig große Widerstandsfähigkeit gegen Borsäure. Bei kurzer Einwirkungsdauer halten sie 2 proz. Lösungen noch stand und überleben, wenn auch stark geschwächt, noch die 3 proz. Lösung. Aber schon nach 8 Tagen ist auch in der 2 proz. Lösung die Lebenskraft schon stark beschränkt. Mit der Länge der Einwirkung nimmt auch in der 1 proz. Lösung die Zahl der lebensfähigen Keime stark ab, um bei längerem Verweilen schließlich zur Abtötung der Bakterien zu führen.

c) Merkwürdig ist das Verhalten der beiden geprüften Milchsäurebakterienstämme, die in ihrer Widerstandsfähigkeit gegen die Borsäure stark voneinander abweichen.

St. I zeigt eine ziemlich große Widerstandsfähigkeit noch nach 8täg. Behandlung mit 3 proz. Lösung; auch die 4 proz. wird, allerdings unter starker Verminderung der lebensfähigen Zellen immerhin noch ertragen. Die 2 proz. Lösung übt auch nach 2 wöch. Be-

handlung nur eine geringe keimtötende Wirkung aus, ebenso wie eine 1 proz. Lösung auch noch nach 4 wöch. Einwirkungsdauer.

Der St. II dagegen wird bereits nach 24stünd. Aufenthalt in Wasser schon so geschädigt, daß er nicht mehr lebensfähig ist, trotzdem er 15 Min. lang sogar noch eine Borsäurekonzentration von 4% ohne nennenswerte Schwächung aushält (Tab. 3).

Eine nähere Erklärung dieses offenbar in der biologischen und physiologischen Verschiedenheit begründeten Verhaltens der beiden Stämme läßt sich nicht geben.

Durch diese Feststellungen ist also das Fehlen von Bakterien in der Borwasserflora hinreichend erklärt.

Zusammenfassung.

1. Die Untersuchung der in Apotheken und Drogerien käuflichen ca. 3proz. Borsäurelösungen (Borwasser) hat ergeben, daß diese ausnahmslos nicht keimfrei sind.

2. Die Zahl der in den käuflichen Borwässern ermittelten Organismen schwankte zwischen 444—56 800 in 1 ccm.

3. Als regelmäßige biologische Verunreinigungen finden sich vornehmlich rote Torulaarten, meist in zwei verschiedenen Farbtönen (blaßrot und tiefrot), ferner häufig „schwarze Hefen" und namentlich in den Borwässern der Drogerien auch Dematium.

4. Die gefundenen Organismen zeigen eine so große Widerstandsfähigkeit gegen Borsäure, daß sie selbst in Jahre alten Borwässern noch in erheblicher Anzahl im lebenden Zustand erhalten sind. In 1 Jahre alten bei Zimmertemperatur gestandenen Borwässern wurden in 1 ccm noch 157—448, in einem 3 Jahre alten Borwasser noch 75 Organismen, im letzteren Fall ausschließlich rote Torula gefunden.

5. Mit sterilem Wasser im Laboratorium hergestellte Borsäurelösungen erwiesen sich auch nach monatelanger Aufbewahrung noch als steril. Die in käuflichen Borsäurelösungen der Apotheken und Drogerien vorkommenden Organismen sind offenbar in den dort verwendeten Vorratsbehältern infolge ihrer großen Widerstandsfähigkeit schon heimisch, da sie anscheinend auch von den zur Reinigung dieser Gefäße verwendeten Reinigungsmitteln nicht abgetötet werden.

6. Eine systematische Prüfung von 19 Organismen aus allen möglichen Organismengruppen auf ihr Verhalten gegen 1—4 proz. Borsäurelösungen hat ergeben, daß keiner der geprüften Organismen die große Widerstandsfähigkeit gegen Borsäure besitzt, wie die in käuflichen Borsäurelösungen gefundenen Organismen, die durch die Versuche eindeutig bestätigt wurde. Die meisten Organismen gehen schon nach 8 täg. Verweilen in höheren als 1 proz. Borlösungen zugrunde. Auch letztere wird nur in seltenen Fällen länger als 2 Wochen und dann nur unter starker Schwächung der wenigen überlebenden Keime ertragen (Oidium, Monilia, Milchsäurebakterien).

7. Die ermittelten biologischen Verunreinigungen lassen die übliche Verwendung des käuflichen Borwassers und die Verwendung der Borsäure zur Konservierung von Nahrungsmitteln recht zweifelhaft erscheinen.

Literaturverzeichnis.

1. Kossowicz, Alex., Ztschr. f. d. landw. Versuchswes. Österr. Bd. 6. 1903. — 2. Fabian, F. W. und Cullough, N. B., Journ. of Bact. Vol. 27. 1934. — 3. Will, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 39. 1913. — 4. Wirth, E., Münch. med. Wochenschr. Bd. 72. 1925. — 5. Boeseken, J. und Watermann, H. I., Folia Microbiol., Holländ. Beitr. f. ges. Mikrobiol. Jahrg. 1. 1912. — 6. Voicu, J., Bact. Soc. Chin. Romania, Bukarest. Vol. 11. — 7. Forster, Hygien. Rundschau. 1909. — 8. Lansberg, L. M., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 51. 1920.

Nachdruck verboten.

Zur Arbeit F. Wagner: Über Ammoniumsalze und Aminosäuren als Stickstoffquellen der Preßhefeerzeugung.

Von **H. Claassen**, Köln.

In der Abhandlung, die F. Wagner unter dieser Überschrift in dieser Zeitschrift, Bd. 93, S. 359 veröffentlicht hat, behauptet er, daß er durch seine Versuche „die Theorie Claassens nicht erhärten konnte", nach der aus 1 kg Aminosäuren ½ kg Hefetrockensubstanz entstehen soll. Diese Angabe über meine Theorie beruht auf einem Irrtum. Ich habe niemals behauptet, daß aus 1 kg Aminosäuren stets ½ kg Hefekörpermasse entsteht, sondern ich habe aus meinen Versuchen und denen anderer Hefetechniker den Schluß gezogen (Ztschr. Ver. dtsch. Zuckerindustr. 1934. S. 737), daß die Aminosäuren nicht nur Stickstoffquellen, sondern auch Kohlenstoffquellen für die Hefe sind, was bisher von den Hefetechnikern nicht erkannt oder bestritten wurde. Dabei habe ich ausdrücklich betont, daß nur ein Teil des Gewichts der Aminosäuren in Hefekörpermasse umgewandelt wird, bei der Verarbeitung von Melasse mit 5—6% Aminosäuren z. B. ungefähr die Hälfte, daß aber dieses Verhältnis mit den jeweilig herrschenden Umständen stark wechselt und viel kleiner wird, wenn assimilierbarer Kohlenstoff in Form von Zucker im Überschuß vorhanden ist.

Die Versuche Wagners, die allerdings nur unvollkommen beschrieben sind und deren Ausführung in mancher Hinsicht zu beanstanden ist, haben Ergebnisse gebracht, die meine Theorie, wie ich sie wirklich aufgestellt habe, durchaus erhärten.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Schedl, Karl E., Der Schwammspinner (Porthetria dispar L.) in Euroasien, Afrika und Neuengland. Monographien zur angewandten Entomologie, Nr. 12. Berlin (Verl. Paul Parey) 1936. 242 S., 95 Abb. u. 26 Tab. Preis geh. 16 RM.

Bei dem heutigen Umfang der Schädlingsbekämpfungsliteratur ist es zu begrüßen, wenn in größeren Zeitabständen die über wirtschaftlich wichtige Schädlinge vorliegenden Forschungsergebnisse in „Monographien" zusammengestellt werden. Es wird durch solche zusammenfassenden Arbeiten ein Zusammenhang zwischen einzelnen Teilgebieten geschaffen, der bei der Fülle und Unübersichtlichkeit der Literatur leicht verloren geht, der aber für die Weiterarbeit notwendig ist.

Der Verf. wählte als Gegenstand für eine solche Monographie den Schwammspinner und zeigte unter weitgehender Benutzung der Schwammspinner-Literatur (600 Arbeiten), wie dieser Schädling durch seine große wirtschaftliche Bedeutung für Nordamerika und durch die über ihn vorliegenden Erfahrungen und Forschungsergebnisse als Schulbeispiel gelten kann für Fragen der Massenvermehrung und der Ausarbeitung geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen (insbes. der praktischen Anwendung biologischer Bekämpfungsmethoden und wirksamer Quarantänemaßnahmen) und als warnendes Beispiel für eine trotz fachmännischer Warnungen von staatswegen oft für unnötig erachtete und daher zu spät oder ungenügend einsetzende Organisation der Bekämpfung. In einzelnen Kapiteln werden Genetik, Fraßpflanzen, Fraßgewohnheiten und Schaden, Ausbreitung und Bekämpfung in Neuengland, Gradationen in Europa, Asien und Nordafrika, Einfluß von Klima und sonstigen Faktoren auf Entwicklung und Ausbreitung, Krankheiten, Parasiten und Räuber und Vorbeugungs- und Bekämpfungsmaßnahmen behandelt. Die Arbeit bringt in guter Auswahl und klarer Zusammenstellung alles, was in einer räumlich begrenzten Monographie gebracht werden kann, und muß daher jedem, der sich mit solchen Pflanzenschutzfragen beschäftigt, empfohlen werden.

Trappmann (Berlin-Dahlem).

Peters, Gerhard, Chemie und Toxikologie der Schädlingsbekämpfung. Sammlung chemischer und chemisch-technischer Vorträge. Neue Folge, Heft 31. Stuttgart (Verl. Ferd. Enke) 1936. 120 S., 22 Abb. Preis geh. 9.20 RM.

Verf. zeigt, daß Forschungen auf dem Gebiet der Schädlingsbekämpfung heute unbedingt der engsten Zusammenarbeit der Biologie und der Chemie bedürfen. Es ist erfreulich, daß gerade der Autor, der selbst reiche biologische und chemische Erfahrungen über die zur Schädlingsbekämpfung verwendeten Giftgase besitzt, in seiner Arbeit eine grundsätzliche, klare Zusammenstellung der bisher angewandten Prüfungs- und Untersuchungsmethoden bringt. In einzelnen Kapiteln behandelt er Richtlinien zur Prüfung und Beurteilung chemischer Bekämpfungsmittel, eine Charakteristik und eine Einteilung der Giftwirkungen, Methoden zur vergleichenden Bewertung der Giftigkeit, die Möglichkeiten einer Steigerung der Giftwirkung durch Zusatzstoffe und Kombinationen und die apparativen Mittel der Untersuchungs- und Prüfungsmethoden. Die für Vergasungsmittel bestehenden äußerst exakten und ausreichend kontrollierbaren Prüfungs- und

Bewertungsmethoden werden besonders ausführlich behandelt. Verf. bringt damit eine willkommene Ergänzung aller ähnlichen in der Schädlingsbekämpfungsliteratur bisher erschienenen Zusammenstellungen, in denen die mehr auf dem Gebiet der Ungezieferbekämpfung ausgearbeiteten Giftgas-Prüfungsmethoden mehr oder weniger nebensächlich behandelt wurden. Das Buch muß daher jedem auf dem Gebiet der Schädlingsbekämpfung tätigen Biologen und Chemiker empfohlen werden.

Trappmann (Berlin-Dahlem).

Allgemeines und Methodisches.

Heicken, H., Über die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration von unbeimpfter Nährbouillon beim Sterilisieren und Lagern. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. Bd. 135. 1936. S. 513—521.)

Beim Sterilisieren der Bouillon ändert sich die Reaktion gegen den Neutralpunkt hin. Die Veränderungen sind um so größer, je weiter der anfängliche p_H-Wert vom Neutralpunkt entfernt ist. Die schwach sauren Proben bleiben praktisch unverändert. Im p_H-Bereich 7—8 erfährt Fleischwasserbouillon (mit 0,2% Kochsalz, 0,3% sekundärem Natriumphosphat und 1% Pepton Witte) im Mittel eine Abnahme des p_H-Wertes um 0,1, zwischen 8—9 um 0,2 und zwischen 9—10 um etwa 0,25. Diese Werte wurden nach 2stünd. Sterilisation im strömenden Dampf ermittelt. Bei Anwendung höherer Temperaturen sind die Reaktionsveränderungen noch größer.

Auch das Lagern der Bouillon wirkt sich ganz in der gleichen Weise aus wie das Sterilisieren, was durch die Kohlensäure der Luft bedingt ist, die bis zur Erreichung eines Gleichgewichtes von der Bouillon absorbiert wird. Für besondere Zwecke kann die Kohlensäureaufnahme durch Vorschalten von Natronkalkröhrchen verhindert werden. Die Aufbewahrungstemperatur ist ohne wesentlichen Einfluß auf die Reaktionsänderung.

Zur Erleichterung der Einstellung der Bouillon auf verschiedene p_H-Werte stellt man sich zweckmäßig eine Titrationskurve her, indem man zu 100 ccm Bouillon steigende Mengen n/1 NaOH gibt und den nach jeder Zugabe erreichten p_H-Wert mißt. Trägt man in ein Koordinatensystem die Anzahl Kubikzentimeter NaOH auf die Ordinate und die entsprechenden p_H-Werte auf die Abszisse auf, so erhält man eine Kurve, die gestattet, die jeweils für ein bestimmtes p_H erforderliche Menge NaOH im voraus zu bestimmen (Titrationskurven aus verschiedenen Kochungen sind fast identisch). Aus dem Verlauf der Kurve kann auch auf das Pufferungsvermögen der Bouillon geschlossen werden. Die Neigung gegen die X-Achse ist ein Maß für die Pufferung. Je flacher die Kurve verläuft, um so geringer das Pufferungsvermögen. Geradliniger Kurvenverlauf besagt, daß die Pufferung im ganzen Bereich der Kurve gleichwertig ist.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Brandt, W., Der schwere Wasserstoff. Seine Bedeutung bei der Untersuchung chemischer und biologischer Fragen. (Chemiker-Zeitg. Bd. 60. 1936. S. 285—288.)

Die meisten Enzymreaktionen verlaufen in schwerem Wasser langsamer als in gewöhnlichem Wasser. Dies gilt nicht für die Inversion des Rohrzuckers und die Esterhydrolyse von Methyl- und Äthylazetat, die in schwerem Wasser schneller verlaufen. Die Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeit sind stark abhängig von der Temperatur und von der Deuteriumoxydkonzentration des Reaktionsmilieus. Daraus erklärt es sich, daß bei Algen, Pilzen, Sporen, Bakterien und anderen niederen Organismen oft unter niedrigen D_2O-Konzentrationen eine Zunahme von Wachstum, Atmung oder Teilungsgeschwindigkeit beobachtet wurde, während hohe D_2O-Konzentrationen ausnahmslos hemmend wirkten. Schweres Wasser kann von den Pflanzen ebenso assimiliert werden wie von Tieren, doch geht die Assimilation beispielsweise bei Algen etwa 2—3mal langsamer als bei gewöhnlichem Wasser vor sich. Heuß (Berlin).

Damm, H., Über eine neue Ausführung der Rollröhrchenkultur und ihre Verwendbarkeit für die Keimzahlbestimmung in Milch. (Milchwirtsch. Forschungen. Bd. 17. 1935. S. 51—64.)

Verf. liefert die experimentellen Unterlagen und ihre statistische Auswertung für eine kulturelle Schnellmethode zur Keimzahlbestimmung in Milch, die sich auf der Esmarchschen Rollkultur aufbaut. Diese Methode hat gegenüber der Ausstrichkultur nach Burri den Vorteil der besseren Vergleichsmöglichkeit mit der heute noch immer als Standard geltenden Plattenkultur. Die Rollröhrchen sind mit einer halsähnlichen Einschnürung versehen, die verhindern, daß der Nährboden den Wattestopfen benetzt (DRP.). In einem besonderen Apparat können mehrere Röhrchen zugleich ausgerollt werden. Meewes (Kiel).

Schütza, M., Ein neues Gerät zur Bestimmung der Konzentration von Fluorammonlösungen. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 405—406.)

Bei der üblichen Titration der als Desinfektionsmittel viel verwendeten Fluorammonlösungen mit Barytlauge wird durch die Kohlensäure der Luft Bariumkarbonat gebildet, die Bürette verstopft sich rasch, der Titer ändert sich, die Bestimmung wird ungenau. Bei einem neuen Gerät der Firma H. Güttes in Bochum ist zur Bestimmung der Fluorammonkonzentration die Titrierflasche mit einem Natronkalkaufsatz gegen Kohlensäurezutritt, das Gefäß für die zu untersuchende Lösung mit einem Speziallack gegen den Angriff der Flußsäure geschützt. Außerdem sind Marken und Tabellen angebracht, die es ermöglichen, sofort nach der Titration den Gehalt der Fluorammonlösung abzulesen. Heuß (Berlin).

Ondratscheck, K., Über die Brauchbarkeit einiger Glassorten für Algenreinkulturen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 532—538.)

Wie für alle Mikroorganismen, so spielt namentlich auch für die meist sehr empfindlichen Algen die Glassorte bei der Züchtung eine große Rolle. Von den 12 untersuchten Sorten waren zur Züchtung (die hier nur behandelt wird; für die Erzielung der Fortpflanzung gelten z. T. andere Gesichtspunkte) am besten geeignet Jenaer, Eserco- und Neutromuranoer Glas; Palex-, Thüringer und Deutsches Maschinenglas sind nur teilweise geeignet, die übrigen Sorten (Kavalir-Gläser) sind wenig geeignet; in einem Falle konnte z. B. nur die resistente Chlamydomonas gezüchtet werden, während alle übrigen abstarben. Die Eignung geht im Allgemeinen einer geringeren Alkaliabgabe parallel.

Rippel (Göttingen).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Schäffner, A., Über die Enzyme der alkoholischen Gärung. (Chemiker-Zeitg. Bd. 60. 1936. S. 278.)

Die Phosphorylierungsreaktion zellfreier Hefeextrakte, die zur Bindung anorganischen Phosphates und Bildung von Hexosephosphorsäureester führt, ist eine mit der Oxydoreduktion von Hexosediphosphat (H. D. P.) gekoppelte, durch die Hefephosphatese zustande gebrachte Reaktion. Dieses Enzym ist mit den bis jetzt bekannten Hefephosphatasen nicht identisch. Mit dem gereinigten Enzymsystem bleibt die Veresterung auf der Stufe des Monoesters stehen, mit rohen Zellextrakten geht die Phosphorylierung bis zum Hexosediphosphat. Für diese zweite Stufe ist ein anderer Phosphorylierungsmechanismus verantwortlich. Die Phosphorylierung von Hexose durch Umesterung mit Adenosintriphosphorsäure (A. T. P.) durch Heterophosphatese steht in keinem direkten Zusammenhang mit der Veresterung anorganischen Phosphates. Jeder der beiden Phosphorylierungsmechanismen ist für sich allein möglich, die Hetero-

phosphatese ist mit der Phosphatese nicht identisch. Beide Systeme können sich jedoch ergänzen in der Weise, daß die durch H. D. P. induzierte Phosphorylierung nur zur Stufe des Monoesters führt, der dann durch Umesterung mit A. T. P. zum Diester aufphosphoryliert wird. Neben diesen beiden gibt es in zellfreien Hefeextrakten noch einen dritten Weg, auf dem Phosphat übertragen werden kann, der aber noch nicht erforscht ist.

Heuß (Berlin).

Seiffert, W., Das Staphylotoxin. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 135. 1935. S. 100—108.)

Das Staphylotoxin stellt ein lipoid-spezifisches Ferment dar. Im Anschluß an die Bindung zwischen Staphylotoxin und Lipoid treten Permeabilitätsstörungen auf, und diese leiten die Zytolyse ein. Für den durch Staphylotoxin bedingten Ablauf der Hämolyse ist aber nicht nur der Gehalt an bindender Substanz von Bedeutung, sondern auch die Gegenwart bestimmter Ionen (Alkalien beschleunigen, Erdalkalien verzögern die Hämolyse). Die Ionen haben dabei keinen Einfluß auf die Bindung des Toxins an die Lipoide oder auf deren fermentative Spaltung, sondern greifen in die Permeabilitätsstörungen ein, die die Bindung des Giftes an die Lipoide zur Folge haben.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Anreicherung von Preßhefen mit Enzymen. Pfeifer & Langen, G. m. b. H., Köln a. Rh. DRP. 621 754, Kl. 6 a.

Man ersetzt einen Teil (mindestens 5%) einer zuckerhaltigen Nährlösung, z. B. einer Melasselösung, durch verzuckertes Malz und hält die Wasserstoffionenkonzentration während der Gärung entsprechend bei p_H = 4,0—5,2.

Schütz (Berlin).

Peragallo, I., Recherches touchant l'immunité sur les bactériophages du Bacille paratyphique „A" et „B", et du B. Coli dans leurs phases „R" et „S". (Soc. Intern. Microbiol. Boll. dell Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 419—426.)

Von den Wuchsformen R, S und RS der Paratyphusbakterien „A" und „B" und des Bacterium coli hat Verf. Bakteriophagen gewonnen, die sämtlich unterschiedliche und durchaus spezifische Eigenschaften aufwiesen. Besonders wichtig erscheint die Beobachtung, daß die Bakteriophagen der Formen S und RS stark immunisierende, diejenigen der R-Form dagegen nur sehr schwach immunisierende Eigenschaften zeigten.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Bötel, W., Studien über Hefen aus der Gattung Mycoderma und verwandten Gattungen in Milchprodukten. Inaug.-Diss. Kiel. 1935. 52 S., 12 Abb.

29 aus Butter und Käse isolierte Pseudosaccharomyceten, die der Gattung Mycoderma nahestehen, wurden näher untersucht und ihren morphologischen Merkmalen gemäß in 5 Gruppen eingeteilt: 1. Eutorulaähnliche, 2. Mycodermaähnliche (Wegweiserverbände), 3. Mycodermaähnliche (fadenähnlich, ohne Seitensprosse, unverzweigt), 4. Mycodermaähnliche (gedrungene Zellen mit wurstförmigen Sproßzellen, verzweigte sparrige Verbände), 5. Moniliaähnliche (mycelartig in langen Verbänden, hefenartige Seitensprosse, unseptiert). Die Gruppen 1—4 zählt Verf. zur Gattung Mycoderma Will, die Gruppe 5 zur Gattung Pseudomonilia Geiger.

Es wurden starke Abweichungen von den normalen Zellformen beob-

achtet. Bei anaerober Züchtung trat in den Federstrichkulturen bisweilen mycelartiges Auswachsen normaler Zellen ein.

Bei einem Stamm konnte Bildung von Sporen (die auf der Gipsblockkultur nie eintrat) durch 24 stündige anaerobe und anschließende 4 tägige aerobe Bebrütung erzielt werden. Meewes (Kiel).

Demeter, K. I., Über neuzeitliche Milcherhitzung (Pasteurisierung). (Chemiker-Zeitg. Bd. 60. 1936. S. 73—75 u. 96—98.)

Bei der Pasteurisierung der Milch wird die Forderung nach restloser Abtötung nur für die pathogenen Erreger gefordert, im allgemeinen werden 99,0—99,9% der ursprünglich vorhandenen Keime vernichtet. Im übrigen ist die Pasteurisierwirkung eines Apparates keine unveränderliche Größe, sondern sie wechselt mit der Zusammensetzung der in der Milch vorhandenen Flora und dem physiologischen Zustand der Keime. Für alle Systeme, die beschrieben werden (Hocherhitzung, Kurzzeiterhitzung und Dauerpasteurisierung), gilt die Forderung, daß genügend säurebildende Bakterien am Leben bleiben, um unerwünschte Eiweißzersetzer und Alkalibildner an der Entwicklung zu verhindern, außerdem müssen nachträgliche Infektionen so weit wie möglich ausgeschaltet werden.

Verf. erwähnt zum Schluß noch einige Milchentkeimungsverfahren, die jedoch über das Versuchsstadium noch nicht hinausgekommen sind, nämlich die Behandlung der Milch 1. mit ultravioletten oder ultraroten Strahlen, 2. durch gleichzeitige Einwirkung einer stillen elektrischen Entladung im luftverdünnten Raum und eines magnetischen Kraftfeldes, 3. durch Elektrolyse (Elektroentsäuerung) und 4. durch Einwirkung von hochfrequenten Tonwellen. Heuß (Berlin).

Chilson, W. H., Yale, M. W., and Eglinton, R., Detecting recontamination of pasteurized milk by bacteriological methods. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 337—343.)

Es wurde während 1 Jahres in 2 Pasteurisierungs-Molkereien der beobachteten Reinfektion nachgegangen, und zwar gleichzeitig mit Hilfe der Standardagar-Plattenmethode und der Zählung der Coli-Organismen. Zum Zählen der Coli-Organismen diente die Plattenmethode (Gußverfahren) mit Laktose-Desoxycholat-Agar. Nach der Verfestigung des Agars wurden 3 ccm desselben Agars nochmals über die Oberfläche ausgegossen, um durchweg Tiefenkolonien zu erreichen, was die Identifizierung von Coli-Kolonien wesentlich erleichterte. Nach einer Bebrütung von 20—24 Std. bei 37° C wurden die tiefroten Coli-Kolonien gezählt. Im vorliegenden Falle konnte immer bestätigt werden, daß die tiefroten Kolonien auf den Platten von pasteurisierter Milch tatsächlich auch von Coli-Bakterien herrührten. Ergebnisse: In der Regel konnte die Reinfektion gleich gut durch die Bestimmung der Gesamtkeimzahl auf Standardagar wie durch die beschriebene Coli-Zählung festgestellt werden. Da aber in einigen Fällen beobachtet wurde, daß entweder nur die eine oder die andere Methode eine Feststellung der Infektion gestattete, wird von den Verff. dafür eingetreten, daß die Coli-Probe die Standard-Plattenmethode nicht ersetzen, sondern nur ergänzen soll. Als Hauptquellen der Reinfektion konnten auf Grund der Coli-Probe in 42 Fällen folgende gefunden werden: 1. Unterlassen des Ausdämpfens der Milchleitungen, die vom Pasteurisierungsapparat wegführten, 2. ungenügende Reinigung und

Sterilisierung der Milchpumpe und 3. Abtropfen von Milch und Wasser in den Flaschenabfüllapparat, und zwar aus Verbindungsstücken von Leitungen, die vorher durch menschliche Berührung infiziert worden waren. Die letztgenannte Infektionsquelle erschien besonders gefährlich. Im weiteren wurde festgestellt, daß in einer sachgemäß pasteurisierten Milch, sofern sie frei von Reinfektion ist, in 1 ccm keine Coli-Organismen mehr nachzuweisen sind.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Stark, C. N., and Curtis, L. R., Evaluation of certain media for the detection of colon organisms in milk. (Am. Journ. of Public Health. Vol. 26. 1936. p. 354—356.)

In Elektiv-Nährmedien für den Nachweis von Coli-aerogenes-Organismen in Milch müssen auch ganz geringe Einsaaten Wachstum und Gasbildung ergeben, ohne daß andere, nicht zu dieser Gruppe gehörenden Laktose-Vergärer (z. B. aerobe und anaerobe Sporenbildner) zum Zuge kommen. Auch besteht die Möglichkeit, daß durch einen nicht gasbildenden Laktose-Vergärer in Gegenwart eines anderen Nicht-Laktose-Vergärers, der jedoch aus Glukose Gas und Säure bildet, in Abwesenheit von Coli-aerogenes-Organismen Gasbildung verursacht werden kann. Auch sollten Änderungen in der p_H oder Zufügung von eiweißhaltigem Material die Brauchbarkeit nicht herabsetzen.

Folgende Medien wurden in die Untersuchung einbezogen: Kristallviolett-Bouillon, Dominick-Lauter-Bouillon, Gentiana-violett-Gallewasser, Brillantgrün-Galle, Formiat-Ricinoleat-Bouillon sowie Brilliantgrün-Galle mit 0,5% Zusatz von Natriumformiat. Ergebnisse: Gasbildner aus Glukose, wie z. B. die Salmonella- und Proteus-Gruppe, können in all diesen Nährmedien gedeihen. Die Spaltung von Laktose durch Mikrokokken, die in manchen dieser Medien ebenfalls wachsen können, macht es möglich, daß in Verbindung mit der Proteus-Gruppe in Abwesenheit von Coli-aerogenes-Organismen Gas gebildet wird. Der entgiftende Einfluß von 1 ccm Milch in all diesen Medien, Formiat-Ricinoleat-Bouillon ausgenommen, konnte mit Leichtigkeit beobachtet werden, weshalb sie für den Nachweis der Coli-aerogenes-Gruppe in Milch unbrauchbar sind. In der Formiat-Ricinoleat-Bouillon ergaben auch ganz geringe Einsaaten von ein oder mehr Zellen Wachstum und Gasbildung. Das Natriumformiat schwächt die hemmende Wirkung des Natrium-Ricinoleats auf das Wachstum der Coli aerogenes-Gruppe etwas ab. Es tritt stärkeres Wachstum und stärkere Gasbildung ein, was nicht bloß auf die puffernde Wirkung dieser Substanz, sondern auch auf die Fähigkeit dieser Gruppe, aus Ameisensäure Gas zu bilden, zurückzuführen ist. Außer der Coli-aerogenes-Gruppe ist auch noch die Salmonella-Gruppe in der Lage, in diesem Medium Kohlensäure und Wasserstoff zu bilden, und zwar aus der Ameisensäure. Dadurch, daß infolgedessen die H-Ionenkonzentration nicht tiefer als p_H 6,0 sinkt, wird wiederum das Wachstum und die Gasbildung durch die Coli-aerogenes-Gruppe gefördert. Die Tatsache, daß auch die Salmonella-Gruppe zum Zuge kommt, ist für diesen Nährboden eher ein Vorteil als ein Nachteil, weil auch die Anwesenheit dieser Bakterien in Milch nicht geduldet werden darf. Andere Bakterien, die ausprobiert wurden, waren nicht in der Lage, in diesem Nährboden Gas aus Natriumformiat zu bilden. Auch die Zugabe von Milchprotein stört den Ablauf der Gasbildung in keiner Weise (bis zu 1 ccm Milch).

Infolgedessen ist von den untersuchten Elektiv-Nährböden nur die Formiat-Ricinoleat-Bouillon als für den Nachweis der Coli-aerogenes-Gruppe in Milch geeignet zu betrachten.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Kellermann, R., Die Notwendigkeit und die praktische Durchführung der bakteriologischen Butteruntersuchung. (Molkereizeitung. 1936. S. 526—528.)

Zur bakteriologischen Untermauerung der Sinnenprüfung bei der Butterkontrolle, die immer individuell bedingt ist, schlägt Verf. folgende Methoden vor:

1. Feststellung des Gehaltes an schädlichen Keimen (Schimmelpilze, Hefen und Bakterien) annäherungsweise durch Einimpfen von zwei gleich großen Ösen in Röhrchen mit Chinablau-Milchzucker-Bouillonagar und Würzeagar (Bebrutung 48 Std. bei 30° C). Jede größere Verunreinigung mit anderen Keimarten als Milchsäurebakterien läßt sich auf diese Weise leicht feststellen.

2. Nachweis von Gas- und Indolbildnern aus der Coli aerogenes-Gruppe durch Verimpfen in Neutralrot-Traubenzucker-Bouillonagar und Trypsin-Bouillon (Bebrütung 24 Std. bei 37° C). Ein positiver Ausfall gestattet immer einen Schluß auf grundlegende Fehler bei der Milch- und Rahmverarbeitung, insbesondere bei der Reinigung und Desinfektion der Molkereigeräte.

3. Feststellung von eiweißabbauenden Keimen durch Beimpfen von Peptonwasser (Fäulnisgeruch).

4. Nachweis der fettspaltenden Fluoreszenten auf alkalischer Milchplatte.

Ein für diese Proben aufgestelltes Schema soll im Zusammenhang mit den Angaben der Sinnenprüfung die Butterkontrolle ganz wesentlich erleichtern. Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung werden ebenso wie diejenigen der Sinnenprüfung mit 20 Höchstwertmalen punktiert. Der Mangel an Hefen und Schimmelpilzen wird im besten Falle mit 8 Punkten angesetzt, während die übrigen Prüfungsarten nur je 4 Wertmale erhalten. Nach einigen orientierenden Vorversuchen wurde dieses Prüfungsschema im Bereich des Milchwirtschaftsverbandes Niedersachsen für die Prüfung von Markenbutter angenommen mit dem Zwecke, sie später auch auf die Markenbutteranwärter auszudehnen. — Auf Grund der inzwischen durchgeführten 355 Butterprüfungen ergab sich folgendes: Bei 265 Proben = 72% stimmte die bakteriologische Prüfung mit der Sinnenprüfung überein. Bei 99 Proben = 28% war dies nicht der Fall. Was die letztgenannten betrifft, so schnitten 30 Proben bei der bakteriologischen Prüfung besser ab als bei der Sinnenprüfung; 69 Proben schnitten bei der Sinnenprüfung besser ab als bei der bakteriologischen Prüfung. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten ist gegeben. Im übrigen zeigte sich, daß bei der üblichen Lagerfrist und Temperatur ein entscheidender Einfluß der Coli-aerogenes- und Proteolyten-Gruppe auf die Güte der Butter anscheinend nicht besteht. Bei Kühlhaus-Butter müßte diese Frage noch nachgeprüft werden. Aus hygienischen Gründen muß jedoch gefordert werden, daß eine solche Butter wegen des bakteriologischen Befundes minder gut bewertet wird als Butterproben, die auf Grund der Sinnenprüfung die gleiche Beurteilung erfahren, aber diese unerwünschten Keime nicht besitzen. Was die Fluoreszenten betrifft, so ließ sich eine Übereinstimmung mit dem Ausfall der Sinnenprüfung niemals ermitteln. Es ist zu erwägen, ob diese Prüfung nicht fallen gelassen werden soll. Der Ausfall der Sinnenprüfung ging jedoch weitgehend mit dem Gehalt der Butter an Hefen und Schimmelpilzen parallel. Ihr Auftreten in Butter ist deshalb unter allen Umständen als Qualitätsverschlechterung anzusehen. Das Bestreben, von vornherein die Güte der angelieferten Milch für auftretende Butterfehler verantwortlich zu machen, muß auf Grund der Untersuchungen vielfach als ungerechtfertigt verurteilt werden.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Stölting, J., Über die Streptokokken des normal reifenden Tilsiter Käses. Beitrag zur Kenntnis beweglicher Streptokokken. Inaug.-Diss. Kiel. 1935. 66 S., 6 Abb.

Aus 4 Käseproben wurden 123 Stämme isoliert. In den Käsen waren folgende Arten vorhanden: Str. lactis, glycerinaceus, bovis, inulinaceus. Str. lactis innocuus wurde nur 2 mal gefunden, Str. liquefaciens einmal. Weiter wurden 12 bewegliche Streptokokkenstämme isoliert, die größtenteils von den Verdünnungsplatten 10^{-6} stammten (4 Stämme von den Platten 10^{-7}). Sie konnten gut und sicher in Klatschpräparaten aus einer 24 stündigen Milchzuckerbouillonkultur mit Kreidezusatz mikroskopiert werden. Die Stämme zeigten 1—2 (nicht polare) Geißeln und wurden als bewegliche Rasse des Str. bovis bestimmt. Eine zwischengeschaltete Dauerkultur schien die Beweglichkeit zu begünstigen.

Die Gesamtstreptokokkenflora der Tilsiter Käse ergab: 70% Str.

lactis, 10% Str. bovis, 2—5% Str. inulinaceus, 0—4% Str. glycerinaceus mit zunehmenden Alter, 10—15% bewegliche Streptokokken. Meewes (Kiel).

Schnegg, H. und Schachner, I., Untersuchungen über die Biersarzina. (Ztschr. f. d. gesamte Brauwesen. Bd. 59. 1936. S. 1—8, 9—14.)

Das Wachstum der Sarzina hängt vor allem von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung ab. Das Optimum liegt bei p_H = 5,8. Minimum und Maximum sind bei jeder Nährlösung anders. Das Minimum schwankte zwischen p_H = 3,9 und 4,9, das Maximum zwischen p_H = 6,4 und 7,1. Ist das p_H einer Nährlösung kleiner als 3,9 oder größer als 7,1, dann wächst die Sarzina nicht, liegt es aber zwischen 4,9 und 6,4, dann wächst sie bestimmt. Während des Wachstums erzeugt die Sarzina Säure und vermag sich dabei an p_H-Werte zu gewöhnen, die unterhalb des Minimums des Anfangs-p_H liegen. Durch Zugabe eines Puffers, der das Sinken des p_H verzögerte und so eine bessere Ausnutzung der Nährstoffe ermöglichte, konnte sowohl die Geschwindigkeit wie die Stärke der Vermehrung vergrößert werden. Das Minimum der Temperatur lag für Würzen zwischen 4 und 8° C, für das untersuchte Bier zwischen 9 und 12° C, das Maximum für Würzen zwischen 30 und 37° C, für das Bier bei 28° C, das Optimum für Würzen bei 26° C, während sich das Bier zwischen 12 und 28° C gleich verhielt. Die Sarzina braucht keine großen Sauerstoffmengen. Ständige, gleichmäßige Bewegung der Nährlösung durch einen langsamen, gleichmäßigen Kohlendioxydstrom vergrößert die Geschwindigkeit der Vermehrung der Sarzina. Zwischen Jodreaktion und Sarzinavermehrung konnte keine eindeutige Beziehung festgestellt werden. Hopfen hat zwar keinen wesentlichen Einfluß auf die Vermehrungsgeschwindigkeit, er verkleinert aber die Stärke der Vermehrung beträchtlich. Die Wirkung der Größe des Extraktes ist selbstverständlich. Die Malzfarbe dagegen übt keinen Einfluß aus. In Würzen ist die Vermehrung der Sarzina eine schnellere und stärkere als in Bieren, die Trübung ist dort auch immer sehr stark, während sie bei Bieren selten den Grad des Schleiers übersteigt. Im Gegensatz zu den Angaben der Literatur wuchs der geprüfte Sarzinastamm in Hefewasser und Autolysat nur schlecht, in Pferdeharn überhaupt nicht.

Für die Praxis ist es wichtig, daß die Würze gegen Sarzina erheblich anfälliger ist als Bier. Ihre Einschleppung durch Würze und auf ihrem Weg zum Gärkeller und durch die Hefe führt deshalb leichter zur Infektion des Bieres, als erst die Einschleppung vom Gär- bis zum Lagerkeller und in diesem. Bei der normalerweise guten Pufferung von Würze und Bier können verhältnismäßig kleine Unterschiede in der Pufferung verhältnismäßig große Unterschiede in der Vermehrungsgeschwindigkeit der Sarzina im Betrieb zur Folge haben. Jedenfalls ist stets guter, extraktreicher Hopfen zu verwenden und der Gehalt der Würze an Hopfenextraktstoffen möglichst zu steigern, auch auf gute Verzuckerung zu achten, um der Sarzina das Aufkommen zu erschweren.

Die Untersuchungen über die Pferdeharnsarzina, die ausgesprochen alkalisches Milieu liebt, lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, daß Bier durch Pferdeharnsarzina infiziert werden kann. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F., Hoch- und niedrigvergärende Hefen und ihre Auswertung in Laboratorium und Praxis. (Tageszeitung f. Brauerei. Bd. 33. 1935. S. 747—748.)

Die Begriffe hoch- und niedrigvergärend gehen zurück auf die beiden Standardtypen Hefe Frohberg und Hefe Saaz, von denen letztere niedriger vergor. Die Zeit hat aber gelehrt, daß, wenn man 20 Hefen nebeneinander untersucht, sie alle verschieden vergären. Im Laboratoriumsversuch läßt es sich überhaupt nicht feststellen, ob eine hoch- oder niedrigvergärende Hefe vorliegt. Die Verhältnisse im Laboratorium und im Betrieb sind nicht ohne weiteres vergleichbar. Die Saazer Hefe ist nach neueren Untersuchungen überhaupt keine eigentliche Kulturhefe, sondern sehr wahrscheinlich eine wilde Hefe, S. cratericus, die ein Bier von rauhem Geschmack und anderen wenig befriedigenden Eigenschaften liefert. In bezug auf die Neigung zu Flocken- und Bruchbildung kann man bei hoch- und niedrigvergärenden

Hefen wohl von Rasseeigentümlichkeiten sprechen, doch werden diese sehr stark durch die äußere Umgebung beeinflußt. Die eigentliche Ursache für die Höhe der Vergärung ist die Zusammensetzung der Würze. Eiweißarme Würzen führen zu hoher, eiweißreiche zu niedriger Vergärung. Bruchhefen sind meist phosphorreicher und zeigen einen höheren Gehalt an Asche, sie speichern mehr Magnesia, Staubhefen mehr Kalk. Bei der Verwendung von Mischhefen bekommen die hochvergärenden bald die Oberhand.

Heuß (Berlin).

Wöllmer, W., Biertrübung durch Eiweißstoffe der Hefe. (Tageszeitung f. Brauerei. Bd. 33. 1935. S. 711—712.)

Gelägerbier kann unter Umständen große Mengen aus der Hefe stammender Stickstoffsubstanzen enthalten, von denen das Zymokasein, das bekanntlich ein Löslichkeitsminimum bei p_H 4—4,5 aufweist, beim Verschneiden mit gewöhnlichem Bier nach 1—2 Tagen als opale, der bekannten Zinntrübung vollkommen ähnliche Trübung ausfallen kann. Gelägerbiere dieser Art zeigen starken Hefegeschmack, dunkle Farbe und ein p_H von 5 bis über 6. Beim Zusatz von 2—3 cm n/1 Salzsäure auf 100 cm Bier (bis zu einem p_H von 4,0) und ebenso beim Aufkochen entstehen mehr oder weniger starke Fällungen von Hefeeiweiß. Auf diese Weise lassen sich die biertrübenden Gelägerbiere leicht erkennen. Sie scheinen nur aufzutreten bei starken Kräusengaben auf das Lagerfaß oder wenn durch sonstige Umstände (zu grünes Schlauchen oder bei Staubhefen) große Hefemengen mit auf das Lagerfaß kommen. Nach bisherigen Erfahrungen enthalten Hefebiere aus der Bottichhefe *niemals* ähnlich große Eiweißmengen wie die erwähnten Gelägerbiere und geben daher auch keine Eiweißtrübungen beim Verschneiden mit normalem Bier. Heuß (Berlin).

Nielsen, N., Untersuchungen über die Fähigkeit der Hefe, hoch- und niedrigmolekulare Stickstoffverbindungen zu assimilieren. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 13—14.)

Durch Dialyse der Würze kann man diese in zwei Fraktionen zerlegen, von denen die hochmolekulare nur sehr wenig assimilierbaren Stickstoff enthält. Daraus geht hervor, daß die Stickstoffverbindungen der Würze, deren Stickstoff durch die Hefe assimiliert werden kann, ausschließlich oder überwiegend niedrigmolekulare Verbindungen sind. Von tanninfällbarem Stickstoff passierte bei den Dialysierversuchen nur ein geringer Teil die Hülse. Heuß (Berlin).

Nielsen, N., Untersuchungen über den Gehalt der Bierwürze an durch Hefe assimilierbarem Stickstoff. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 5—7.)

In den Carlsbergbrauereien in Kopenhagen sind bei Beendigung des Wachstums der Hefe im allgemeinen 30% des Stickstoffs der Würze verschwunden, dieser Endpunkt wird durch Erschöpfung des Zuckers bewirkt. Um nachzuweisen, ob in der Würze noch mehr assimilierbarer Stickstoff vorhanden ist, hat Verf. durch Beimischung einer Nährlösung, die alle für das Hefewachstum wichtigen Stoffe mit Ausnahme des Stickstoffs enthielt, Verdünnungen hergestellt und gefunden, daß in den Konzentrationen $^1/_3$ bis $^1/_{20}$ 49% des Stickstoffs durch die Hefe assimiliert wurden. Nach beendigter Stickstoffaufnahme wurde zugefügtes Ammonsulfat ohne weiteres

von der Hefe assimiliert, womit bewiesen ist, daß die Stickstoffaufnahme nur wegen Mangel an Stickstoff zum Stillstand kam. Der prozentuale Gehalt an assimilierbarem Stickstoff fällt während des Brauprozesses, er betrug beispielsweise beim Einmaischen 60%, auf dem Kühlapparat 49% des Gesamtstickstoffs. Verschiedene Würzeproben wiesen verschiedene Mengen an assimilierbarem Stickstoff auf, die zwischen 34 und 55% des Gesamtstickstoffs schwankten. Im Bier fand man 31—36% des Gesamtstickstoffs assimilierbar. Rhizopus suinus konnte mehr, Klöckeria apiculata weniger Stickstoff assimilieren als Sacch. cerevisiae. Heuß (Berlin).

Fuchs, J., Die Generationsdauer der Hefezellen in Abhängigkeit vom Medium. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 17—20.)

Es liegen Erfahrungen vor, daß Veränderungen des Nährsubstrates bei Kulturhefe Veränderungen in der Generationsdauer hervorbringen. Versuche mit Hefeextrakten ergaben, daß schon geringe Mengen an Wuchsstoffen die Generationsdauer erheblich verkürzen. Verf. gelang der Nachweis, daß auch die Wuchsstoffe von Bierwürze beschleunigend wirken, der Grad der Beschleunigung ist dabei bei verschiedenen Würzen verschieden.

Bei der Prüfung der Einwirkung von Trub, der bekanntlich gärungsfördernd wirkt, wurde festgestellt, daß die Vermehrungsfähigkeit der Hefe sowohl durch den Heiß- und Kühltrub, als auch durch den Kühltrub allein geschädigt wird.

Über die Einwirkung des Hopfens, der bekanntlich eine schädigende Wirkung auf Mikroorganismen ausübt, wurde bei Generationsdauerversuchen mit Kulturhefe, wilder Hefe und einer aus der Luft stammenden Torula festgestellt, daß die Hopfenstoffe bei einer an sie nicht angepaßten Hefe eine Verlängerung der Generationsdauer hervorrufen, während sie bei einer an sie gewöhnten Hefe kaum wirksam sind. Gerstenmehlauszüge bewirkten eine Verkürzung der Generationsdauer, enthalten also zweifellos Wuchsstoffe, wenn auch in geringem Maße, bei Gerstenspelzauszügen waren die Ergebnisse nicht einheitlich. Heuß (Berlin).

Nielsen, N., Untersuchungen über die Bedeutung des Mälz- und Brauprozesses für den Wuchsstoffgehalt der Würze. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 49—52.)

Saccharomyces cerevisiae bedarf zum Wachsen eines oder mehrerer zur Gruppe B gehöriger Wuchsstoffe, die in ihrer chemischen Zusammensetzung noch wenig bekannt sind. Ihr Vorhandensein in der Bierwürze ist zweifellos auf das Malz zurückzuführen. Nicht bekannt ist bisher, ob der Wuchsstoff schon in der Gerste vorhanden ist, ob er erst während des Mälzens gebildet wird, ob während des Brauprozesses Änderungen im Wuchsstoffgehalt der Würze erfolgen und ob verschiedene Würzen erhebliche Abweichungen bezüglich des Wuchsstoffgehaltes aufweisen, sei es infolge verschiedenartiger Mälz- und Brau-Methoden oder durch Unterschiede in den Gerstensorten. Verf. hat diese Fragen näher untersucht und dabei als Maßstab für die Wuchsstoffwirkung auf eine durch geeignete Züchtung wuchsstoffarm gemachte Hefe deren Trockensubstanzproduktion zugrunde gelegt.

In der Gerste fand man einen beträchtlichen Wuchsstoffgehalt, der beim Mälzen um etwa 50% zunimmt, beim Darren tritt dann ein Verlust ein, der wohl auf die Abtrennung der Wurzelkeime zurückzuführen ist. Während des Sudprozesses ist der Wuchsstoffgehalt der Würze in allen Stadien ziemlich gleich. Er ist stets ungefähr direkt proportional der in Lösung gegangenen Stickstoffmenge. Auch bei der Unter-

suchung verschiedener Wurzeproben auf ihren Wuchsstoffgehalt wurden keine größeren Unterschiede ermittelt. Weder Anwendung verschiedener Gerstensorten, noch verschiedene Brau- und Malzungs-Methoden riefen erhebliche Unterschiede hervor. Der Wuchsstoffgehalt der Bierwurze scheint also recht konstant zu sein.

Heuß (Berlin).

Entwässerung von Hefe u. dgl. Poth & Co., Preßhefefabrik, G. m. b. H., Dortmund-Doostfeld. DRP. 621 908, Kl. 6 a.

In einer Zentrifugiervorrichtung wird die abgetrennte Hefe beim Erreichen eines bestimmten Trockenheitsgrades mit Hilfe einer durch die Differenz der elektrischen Leitfähigkeiten beider Komponenten ausgelösten Öffnung der Vorrichtung aus letzterer entfernt. Schütz (Berlin).

Gewinnung von Hefe unter Umrühren der gärenden Flüssigkeit. Norddeutsche Hefeindustrie-A.-G., Berlin. DRP. 621 566, Kl. 6 a.

Das Umrühren findet in Gegenwart des beim Gären gebildeten Alkohols und der entstehenden Kohlensäure in geschlossenen Gefäßen statt, und zwar entweder mittels eines zirkulierenden Gasstromes oder auch mittels strömender Würze, welche durch eine außerhalb des Gärbottichs befindliche Leitung in Umlauf gehalten wird mit einer Geschwindigkeit, die genügt, um den ganzen Inhalt des Bottichs in etwa 10 Min., z. B. mittels Zentrifugalpumpen, durch die Leitung zu treiben. Die Ausbeute an Hefe ist gut.

Schütz (Berlin).

Stockhausen, F. und **Silbereisen, K.**, Hefegummistudien. III. Der Hefegummigehalt im Bier. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 393—397.)

Trotz Anwendung verschiedener Verfahren gelang es nicht, die im Bier tatsächlich vorhandene Menge an Hefegummi zu ermitteln. Es konnte nur bewiesen werden, daß Hefegummi im Bier zweifellos vorhanden ist und daß seine Menge vermutlich etwa 10 mg je Liter beträgt. Diese geringen Mengen sind jedenfalls nur mit mikroanalytischen Methoden zu erfassen. Die Literaturangaben, die mit Hefegummimengen bis zu 90 mg je Liter Bier rechnen, sind zweifellos viel zu hoch.

Der fördernde Einfluß von Hefegummi schon in sehr geringen Mengen auf die Vollmundigkeit und die Schaumhaltigkeit des Bieres konnte experimentell durch Schaummessungen und Geschmacksproben an Bieren, die mit steigenden Hefegummimengen versetzt worden waren, deutlich gemacht werden. Heuß (Berlin).

Weber, E., Sudhausarbeit im Zusammenhang mit Haltbarkeitsfragen. (Tageszeitung f. Brauerei. Bd. 34. 1936. S. 21—22.)

Verf. weist auf seine in vielen Betrieben gemachten Erfahrungen über die Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung der Würze und der Haltbarkeit des Bieres, insbesondere aber über die Zusammenhänge zwischen einer p_H-Verbesserung und der Entwicklung von Sarzinen hin. Die einfachsten Vorbedingungen für eine gute Haltbarkeit des Bieres sind Jodnormalität und richtige Vergärungsverhältnisse und außerdem die Verarbeitung eines richtig gelösten Malzes. In einem sarzinagefährdeten Bier ist für die Ausschlagwürze ein p_H von 5,2 anzustreben. Entkarbonisierung des Brauwassers, biologische Säuerung oder Verwendung von Proteolytmalz sind die gegebenen Hilfsmittel zu diesem Zweck. Heuß (Berlin).

Götz, A., Wesen und Zweck der Kaltsterilisation. (Allgem. Anzeiger f. Brauereien, Mälzereien u. Hopfenbau. Bd. 51. 1935. S. 512—514.)

Die Entkeimungsfilter arbeiten mit einem Filtermaterial, das während des ganzen Filtrationsvorganges steril bleibt und keinerlei Infektionen übertragen kann. Man kann die Kaltsterilisation und die normale Filtration in einem einzigen Filter mit Zwischenstück ohne große Kosten durchführen. Ihre Anwendung bietet vor allem die Möglichkeit, die große Infektionsgefahr der Rest- und Retourbiere auszuschließen. Besonders gute Erfolge erzielt man, wenn man Entkeimungsfilter als Doppelfilter benutzt, und zwar in ihrer ersten Hälfte mit klärenden Schichten als Vorfilter, in der zweiten Hälfte mit entkeimenden Schichten. Die biologische Beschaffenheit solcher Biere ist tadellos. Man kann mit einer derartigen Anlage übrigens auch jederzeit steriles Wasser bereiten, was für die Hefewäscherei besonders vorteilhaft ist. Heuß (Berlin).

Schnegg, H., Kipphan, H. und Grunert, K., Die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf brauereischädliche Mikroorganismen. (Zeitschr. f. d. gesamte Brauwesen. Bd. 59. 1936. S. 21—28, 29—31.)

Verff. haben den Wasserentkeimungsapparat „Uster" der Quarzlampengesellschaft Hanau m. b. H. auf seine Wirkung gegen 15 brauereischädliche Organismen — echte Hefen, unechte Hefen, wilde Hefen, Bakterien und Schimmelpilze — in verschieden starken Aufschlämmungen geprüft und gegenüber den eigentlichen Bierschädlingen eine ausgezeichnete Wirksamkeit gefunden. Es wurde festgestellt, daß auch Hefesporen durch ultraviolette Strahlen mindestens ebenso leicht abgetötet werden, wie gewöhnliche vegetative Zellen. Lediglich Mikroorganismen mit Schleimhüllen erwiesen sich als etwas widerstandsfähiger, was aber für die Brauerei belanglos ist, da diese Organismen nicht als direkte Schädlinge anzusehen sind. Im übrigen werden auch nicht völlig abgetötete Zellen in ihrer Lebenskraft erheblich geschwächt. Organische Substanz in Mengen, die in Betriebswässern nicht mehr vorhanden sein dürfen, schädigten die Strahlenwirkung in keiner Weise. Bei der Bestrahlung etwa entstehendes Wasserstoffsuperoxyd schädigt die Gärkraft der Hefe nicht und ist für die Sterilität des Wassers höchstens von Vorteil. Das entkeimte Wasser muß, soweit es nicht sofort verwendet wird, steril gelagert werden.

Heuß (Berlin).

Leopold, H. und Horak, W., Studium neuartiger Beschädigungen an einer Braugerste. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 409—414 und 422—424.)

Verff. stellten Untersuchungen an mit einer nordmährischen Gerste des Jahrgangs 1932, die wegen starken Befalles mit Schimmelpilzen am 3. Tag von der Tenne abgeräumt werden mußte. Die Gerste enthielt 8,5% Körner, die in der Bauchfurche geplatzt waren, man konnte sie durch den Druck des Fingernagels leicht in 2 Teile teilen. Die Farbe dieser Körner und ebenso ihr Extrakt war dunkler, so daß zu vermuten war, daß durch die Tätigkeit von Schimmelpilzen, ähnlich wie beim Amyloverfahren, die Stärke des Gerstenkornes verzuckert worden sei.

Die um den Spalt liegenden Endospermzellen der beschädigten Körner waren in ähnlicher Weise aufgelost, wie dies sonst nur bei keimender Gerste oder Malz der Fall ist. Durch Würzegelatinekulturen konnte man mit den Körnern dieser Gerste Penicillium glaucum, Rhicopus nigricans, Septosporium, eine Mucor-Art und Aspergillus glaucus zur Entwicklung bringen. Bei den beschädigten Körnern fand man fast ausschließlich Rhicopus nigricans,

der mit Vorliebe auf dem Riß der Bauchfurche zur Entwicklung gelangte. In den beschädigten Körnern war der Wassergehalt niedriger, die Menge an reduzierenden Zuckern größer, die an Saccharose kleiner als bei normalen Gerstenkörnern, die Keimfähigkeit war sehr schlecht. Ein besonders hoher Prozentsatz der beschädigten Körner war sensibilisiert, die aus dem Myzel des Rhicopus nigricans sezernierte Diastase konnte nach Auflösung der Endospermzellen durch die in diesem Pilz gleichfalls vorhandene Cytase die Stärkekörner ohne Strukturveränderung angreifen. Durch besondere Versuche konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß bei der fraglichen Gerste rasche Schwankungen von Feuchtigkeit und Temperatur während des Wachstums, bei der Lagerung oder auch bei unsachgemäßer künstlicher Trocknung die Bauchfurche zum Platzen gebracht und das Aufkommen des Rhicopus nigricans ermöglicht hatten. Die Pilzinfektionen verbreiteten sich dann sehr rasch auch auf die ursprünglich gesunden Körner. Heuß (Berlin).

Mikrobiologie von Holz usw.

Gewecke, F. und Kärst, O., Vergleichende Versuche mit Holzschutzmitteln. (Feuer, Fäulnis und Schädlingsfraß.) (Zeitschr. f. angew. Chemie. Bd. 48. 1935. S. 272.)

Holzschutzmittel, die neben guter Herabsetzung der Brennbarkeit einen einwandfreien Schutz gegen pflanzliche und tierische Schädlinge bieten, sind selten. Verff. haben eine beständige Emulsion hergestellt, die neben feuerhemmenden Bestandteilen einen hohen Prozentsatz an chlorierten Naphthalinen enthält, die ihre gute Wirkung in mykocyder wie insektizider Hinsicht seit Jahren bewiesen haben. Das Produkt, „Xylamon-Feuerschutz" genannt, ist unschädlich für Mensch und Tier, ruft keine Korrosionsschäden hervor und hat sich bei der eingehenden Prüfung gut bewährt.

Heuß (Berlin).

Liese, Heutiger Stand der Holzkonservierung. (Chemiker-Zeitg. Bd. 60. 1936. S. 58.)

Steinkohlenteeröl schützt Schwellen und Kiefernmasten noch nach jahrzehntelanger Lagerung einwandfrei. Bei Buchenschwellen, die nach dem Rüpingschen Sparverfahren behandelt sind, kann mit einer Gebrauchsdauer von über 50 Jahren gerechnet werden. Fichtenstangen und -maste wurden bisher meist kyanisiert, eventuell unter Zusatz von Fluornatrium. Weitgehend unauswaschbare Salzgemische aus Fluorsalzen und Dinitrophenolen, Arsen und Bichromaten können das Sublimat ersetzen. Eine weitere neue Möglichkeit der Konservierung ist in der Anwendung des sogenannten Osmoseverfahrens gegeben, bei dem die genannten Salzgemische in Pastenform auf das frisch geschlagene und sofort entrindete Holz aufgetragen werden. Heuß (Berlin).

Ramstetter, H., Neuzeitlicher Holzschutz und Sachwerterhaltung. (Chemiker-Zeitg. Bd. 60. 1936. S. 173—176.)

Die Bekämpfung holzzerstörender Pilze wie Hausschwamm, Kellerschwamm, Trockenfäule, geschieht mit wasserlöslichen Schwammgiften, hauptsächlich anorganischen Salzen im Gemisch mit organischen Phenol- und Kresolderivaten oder, wo das Einbringen von Feuchtigkeit in den Bau nicht wünschenswert ist, mit Hilfe der sogenannten Xylamontechnik durch Verwendung von wasserfreien, flüssigen Atemgiften in Verbindung mit anorganischen Schwammgiften in Pastenform. Zur Bekämpfung fressender Insekten, wie Hausbock, kann das Heißluftverfahren und die Vergasung mit Blausäure, T-Gas, Schwefelkohlenstoff nur in besonders günstig gelagerten Fällen angewandt werden. Die Xylamontechnik ist auch hier er-

folgreich. Wesentlich ist, daß die Erkenntnis von der Wichtigkeit des Holzschutzes alle maßgebenden Kreise durchdringt. Heuß (Berlin).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Small, F., Diseases of outdoor-grown tomatoes in Jersey. (Journ. of the Ministry of Agric. Vol. 43. 1936. p. 117—124, 2 Taf.)

Als Freilandtomaten werden in Jersey in erster Linie die Sorten Sunrise und Devon's Surprise angebaut. Die stärksten Verluste werden durch Phytophthora verursacht. Meistens tritt die Krankheit auf dem Felde im Herbst auf, manchmal aber auch an den Sämlingen. Zur Bekämpfung der Krankheit wird mit kupferhaltigen Mitteln gespritzt, vor allem mit Kupfersodabrühe. Da diese aber Spritzflecke auf den Früchten hinterläßt, werden vielfach kurz vor der Ernte Kupferammoniakbrühe (Eau céleste) und andere Brühen, die keine Spritzflecke hinterlassen, verwendet. Phytophthora von der Kartoffel kann auf die Tomate übergehen und umgekehrt. Beträchtliche Verluste verursacht auch Didymella Lycopersici. Infektionen mit einem Pilz, der sich am Ende der Vegetationszeit an den Stengeln der Kartoffelsorte Kerr's Pink zeigte und dessen Pykniden denen von Didymella Lycopersici ähnelten, erwies sich als pathogen an den Früchten und Stengeln der Tomate. Zur Bekämpfung der Krankheit ist es wesentlich, daß der Samen nur von gesunden Pflanzen genommen wird, daß die Pfähle mit Formaldehyd desinfiziert werden, daß die kranken Blätter entfernt und die Wunden mit Bordeauxpaste verstrichen werden. Umfall- und Fußkrankheiten kommen in beträchtlichem Maße vor. Verf. empfiehlt Bewässerung der Anzuchtbeete mit 0,01% einer 77 proz. Schwefelsäure. Außerdem hat sich die Bodendämpfung bewährt. Vor dem Auspflanzen werden die Pflanzen am besten in ein Fungizid getaucht. Cladosporium fulvum tritt zwar im Freiland auch auf. Die Verluste sind aber nicht beträchtlich. Die durch Verticillium albo-atrum verursachte Welke kann wesentlich eingedämmt werden, wenn die Pfähle durch 2 proz. Formaldehydlösung (15 Min. tauchen und 48 Std. bedecken) desinfiziert werden. Heterodera marioni Cornu konnte durch Anwendung von Naphthalin, Kalziumcyanid und Paradichlorbenzol nicht bekämpft werden. Botrytis cinerea tritt nur in sehr feuchten Jahren schädigend auf. Dort, wo ein Auftreten wahrscheinlich ist, sind die Seitentriebe rechtzeitig zu entfernen, damit nur kleine Wunden entstehen. Befallene Blätter sind abzuschneiden und die Schnittflächen mit Bordeaux-Paste zu verstreichen. Die Sorte Sunrise schien anfälliger als die Sorte Devon's Surprise zu sein. Septoria lycopersicum tritt in England nur selten auf, ebenso Sclerotinia sclerotiorum. Macrosporium Solani zeigt sich zwar in den meisten Jahren, aber zu spät, um den Ertrag noch merklich zu verändern. Wurzelfäulen, durch Thielaviopsis basicola und Colletotrichum atramentarium hervorgerufen, treten zwar auf, haben aber keine Bedeutung. Dasselbe gilt für die durch Pleospora herbarium, Alternaria tenuis und Fusarium Equiseti verursachten Fruchtfäulen. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Mielke, J. L., and Kimmey, J. W., Dates of production of the different spore stages of Cronartium ribicola in the Pacific Northwest. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 1104.)

Das Auftreten der verschiedenen Sporengenerationen des Weimutskieferblasenrostes (Cronartium ribicola) wird an Hand jahrelanger Beobachtungen im westlichen Teil von Nordamerika (Britisch Columbien, Washington und Oregon) mitgeteilt. Um die Untersuchungsergebnisse besser auswerten zu können, wurde Britisch Columbien in mehrere Regionen unterteilt. Die Feststellungen in diesen Bezirken wurden ebenso wie für Washington und Oregon einzeln in Tabellen aufgezeichnet. Das früheste Auftreten der Aecidien wurde gegen Ende Februar beobachtet.

Röder (Berlin-Dahlem).

Valleau, W. D., Seed transmission of Helminthosporium of corn. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 1109.)

Hartschalige Samen von Zea mays sind gegen Helminthosporium weitaus widerstandsfähiger, als solche mit weniger fest ausgebildetem Perikarp. Die Langlebigkeit einzelner Wirtsherkünfte wird durch den Besatz mit diesem Parasiten nicht beeinflußt. Eine Verfärbung des Perikarps befallener Samen wird bei der Keimung durch eine Behandlung mit Kupferkalkbrühe und einem 20 Min. langen Tauchen in eine Kalklösung (1 Teil CaO, 4 Teile Wasser) verhindert. Gleichzeitig wird hierdurch eine Keimung gefördert. Die Infektion der Samen erfolgt bereits im embryonalen Zustand. Bei Keimversuchen wurde festgestellt, daß tiefschwarze Flecken auf dem Perikarp stets auf die Anwesenheit von Helminthosporium in der Samenschale hinweisen. Die keimhemmende Wirkung der in das Perikarp eingedrungenen Organismen kann durch eine Beizung der Samen (s. o.) beseitigt werden. Röder (Berlin-Dahlem).

Mitra, M., and Bose, R. D., Helminthosporium diseases of barley and their control. (Indian Journ. of Agric. Sc. Vol. 5. 1935. Heft 4. p. 449—484, 2 Taf.)

Verf. berichtet über drei in Indien auf Gerste vorkommende Helminthosporium-Arten, H. sativum P. K. & B., H. teres Sacc. und H. gramineum Rabh. H. sativum tritt häufig auf, erzeugt Fuß- und Wurzelfäulen sowie Fleckenbildung an allen oberirdischen Teilen. H. teres beschränkt sich nur auf eingeführte Gerstensorten, während H. gramineum außerordentlich selten ist. Die Stärke des Befalls hängt von der Jahreszeit, dem Standort und der Gerstensorte ab. Bei den Bekämpfungsmaßnahmen wirkten von den fungiziden Mitteln Quecksilberverbindungen am besten. Eine völlige Beseitigung der Krankheit durch Saatgutbehandlung ist nicht möglich, da die Infektionsgefahr während der ganzen Vegetationszeit besteht. Obige Helminthosporium-Arten können im Boden leben und auch an Weizen und verschiedenen anderen Gräsern auftreten. Zur Beseitigung des Organismus verspricht die Zucht widerstandsfähiger Sorten den besten Erfolg.

Bärner (Berlin-Dahlem).

Drechsler, Ch., A leaf spot of bent grasses caused by Helminthosporium erythrospilum n. sp. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 344—361, 7 figs.)

Verf. berichtet über eine neue Blattfleckenkrankheit an Agrostis alba. Der Erreger wird als Helminthosporium erythrospilum n. sp. beschrieben. Winkelmann (Berlin-Dahlem.)

Christensen, J. H., and Stakman, E. C., Relation of Fusarium and Helminthosporium in barley seed to seedling blight and yield. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 309—327, 4 figs.)

In den Jahren 1932—1934 stellten Verff. Untersuchungen über das Vorkommen von Fusarium und Helminthosporium an einer großen Anzahl von Gerstenproben aus dem Nordwesten der Vereinigten Staaten und über den Einfluß auf die nachfolgende Ernte an. 1932 war Helminthosporium 3—4 mal häufiger als Fusarium. 1933 war der Befall geringer, aber das Verhältnis von Helminthosporium zu Fusarium war etwas größer. Zwischen dem Prozentsatz des Befalls mit Helminthosporium und mit Fusarium und der Keimfähigkeit, dem Auflauf, der Wurzelfäule, der Sämlingsfäule, der Zahl der kümmernden Pflanzen und der Verfärbung der Koleoptile bestehen Beziehungen. Durch Behandlung von infiziertem Saatgut mit Ceresan wurde der Auflauf verbessert und kräftigere Pflanzen erzielt. Durch Ceresan wurde bei infiziertem Saatgut der Ertrag erhöht. Infiziertes mit Ceresan gebeiztes Saatgut erwies sich als nicht so gut wie gesundes. Bei der Sorte Glabron wurde, obwohl sie stark befallen wurde, der Ertrag durch Beizung nicht erhöht. Winkelmann (Berlin-Dahlem.)

Jenkins, Anna E., Present generic status of the citrus scab organism. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 68.)

Der Erreger des Citrus-Schorfes, Sphaceloma Fawcettii, wird von einigen Autoren zu Sporotrichum gestellt. Verglichen wurde der Erreger bei Reinkulturversuchen mit Sporotrichum Schenkii und Sphaceloma ampelinum, sowie dessen vermutlicher Perfektform Elsinoe ampelina (De By.) Shear. Bei Kulturen mit Sabourauds Maltoseagar und auf Kartoffeldextroseagar wurde festgestellt, daß sowohl die großen Farbunterschiede auf Maltoseagar, als auch die Wachstumsunterschiede auf Kartoffeldextroseagar darauf schließen lassen, daß Sphaceloma Fawcettii zu Sporotrichum keine Beziehungen hat. Röder (Berlin-Dahlem).

Mehrlich, F. P., Pathogenicity and variation in Phytophthora species causing heart rot of pineapple plants. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 23.)

Die Herzfäule der Ananas (Ananas comosus L.) tritt in Hawai auf nahezu jedem Felde während der ersten Monate nach dem Pflanzen auf. Das typische Bild der Herzfäule wird erläutert. Weiterhin werden Infektionsversuche mit den verschiedenen Phytophthora-Spezies geschildert. Als Erreger der Herzfäule treten auf den Inseln von Hawai auf: Phytophthora palmivora (zu dieser Spezies werden gerechnet: P. arecae, P. faberi und P. meadii), Phytophthora parasitica (als zugehörig zu dieser Spezies wird P. Melongenae angesehen) und Phytophthora cinnamomi (syn. Pseudopythium phytophthoron). Die einzelnen Phytophthora-Stämme verhielten sich, mit Ausnahme der von P. palmivora, insofern ganz verschieden, als bei Infektionen nur ein Teil der Herkünfte der entsprechenden Spezies die typische Herzfäule verursachte. Es treten hier scheinbar „physiologische Rassen" auf. Ältere Früchte sind wahrscheinlich auf Grund ihres niedrigeren pH-Wertes gegen die Herzfäuleerreger resistenter als die jungen Früchte. Als Wirte der Herzfäuleerreger werden außer der Ananas noch mehrere Unkräuter

und Gründüngungspflanzen genannt. Auf Grund physiologischer und morphologischer Untersuchungen kam Verf. zu dem Ergebnis, daß Pseudopythium phytophthoron ein Synonym von Phytophthora cinnamomi ist und weiterhin, daß P. cinnamomi und P. cambivora als eine Spezies zu betrachten sind. Röder (Berlin-Dahlem).

Raleigh, W. P. und Bonde, R., Seed-potato treatment for rhizoctonia control in northeastern Maine, 1929—1933. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 321—343.)

Verff. berichten über Beizversuche an Kartoffeln zur Bekämpfung von Rhizoctonia. Durch Behandlung von rhizoctoniakranken Knollen der Sorte Irish Cobblers wurde der Auflauf und der Stand der Pflanzen verbessert, die Flecken an den Stengeln und die Zahl der kranken Knollen vermindert und der Ertrag erhöht. Die Behandlung mit Sublimat 1 : 1000 90 Min. tauchen zeigte die besten Erfolge in bezug auf Rhizoctonia-Bekämpfung. Angesäuerte Sublimatlösung 1 : 500 + 1% Salzsäure 3 Min. tauchen ergab zwar eine gute Bekämpfung von Rhizoctonia, doch schien vereinzelt eine Schädigung erfolgt zu sein. Besondere Sorgfalt ist auf das Trocknen der Knollen nach der Behandlung zu legen. Gelbes Merkurioxyd 1 : 100 erwies sich ebenfalls als wirksam, doch waren vereinzelt Schäden zu beobachten. Mit Sublimat 1 : 1200 + Kaliumjodid 1 : 400 wurden gute Erfolge erzielt. Organische Quecksilberverbindungen wie Sanoseed und New improved Semesan Bel waren zwar wirksamer als bei früheren Versuchen, doch waren sie dem Sublimat unterlegen. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Moore, M. B., A method for inoculating wheat and barley with loose smuts. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 397—400, 1 fig.)

Verf. beschreibt einen Apparat, mit dem es möglich ist, bis zu 100% Befall mit Flugbrand bei Weizen und Gerste zu erzielen. An einer Eisenstange, die unten zugespitzt ist, so daß sie in den Boden gestoßen werden kann, ist ein Erlenmeyerkolben befestigt. Dieser Kolben enthält das Infektionsmaterial. Aus dem Kolben führt ein Glasrohr in einen Glaszylinder, der oben einen Stutzen hat, der durch einen Gummischlauch mit einer Saugpumpe verbunden ist. Die zu infizierende Ähre wird in einen Gummistopfen eingeklemmt und in den Infektionszylinder eingeführt.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Aamodt, O. S., Torrie, J. H., and Takahashi, K., The effect of several collections of Tilletia tritici and T. levis on the morphology of spring wheat. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 344—359, 1 fig.)

Verff. stellten die morphologischen Veränderungen an den Sommerweizensorten Reward, Little Club, Pentad, Hope, Kota und Garnet fest, die sich bei Infektion mit Tilletia tritici und T. levis ergeben. Durch die Infektion mit beiden Erregern wurde die Halmlänge verringert. Der kürzere Halm bei infizierten Pflanzen, die aber nicht befallen waren, zeigte an, daß die Infektion zwar angegangen war, daß aber infolge günstiger Bedingungen die Pflanze schneller als der Pilz gewachsen war. Im allgemeinen konnten keine Unterschiede zwischen ganz und teilweise befallenen Pflanzen in bezug auf Größe der Pflanzen beobachtet werden. Eine Verlängerung der Ähre bei Befall trat nur bei den sehr anfälligen Sorten Reward, Little Club und Kota auf. Die Größe der Brandbutten war bei den einzelnen

Sorten verschieden. Die Brandbutten waren im Durchschnitt bei Infektion mit T. tritici kleiner und runder als bei einer mit T. levis.
Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Neatby, K. W., Factors relations in wheat for resistance to Puccinia graminis tritici, Puccinia glumarum and Erysiphe graminis. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 360—374.)

Bei der Kreuzung H - 44 - 24 × Marquis war die Reaktion im Sämlingsstadium gegen Puccinia glumarum gekoppelt mit der Reaktion im Reifestadium gegen P. graminis. Alle Linien mit Resistenz im Reifestadium gegen Puccinia graminis und Anfälligkeit gegen Erysiphe graminis waren resistent oder wenigstens mäßig resistent gegen P. graminis Form 36, während alle Linien, die für diese Form anfällig waren, Resistenz gegen E. graminis zeigten. Bei der Kreuzung Marquilla × H - 44 - 24 war Halbresistenz gegen P. glumarum und Resistenz im Reifestadium gegen P. graminis, Resistenz im Sämlingsstadium gegen P. graminis Form 52 mit Anfälligkeit gegen P. glumarum und Anfälligkeit gegen Form 52 mit Resistenz gegen P. glumarum gekoppelt. Bei der Kreuzung Garnet × Double Cross lagen die Verhältnisse in bezug auf Anfälligkeit im Sämlingsstadium gegen P. graminis Form 35 und P. glumarum ähnlich wie bei der Kreuzung Marquilla × H - 44 - 24 in bezug auf P. graminis Form 52 und P. glumarum. Anfälligkeit gegen P. graminis Form 21 war gekoppelt mit Rotfärbung des Strohs.
Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Crowell, I. H., Index to the relative susceptibility of orchard apples to cedar-apple rust. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 459—461.)

Verf. fand, daß die Zahl der Äzidien von Gymnosporangium Juniperivirginianae in einem Flecken bei den einzelnen Sorten konstant ist. Für den Grad der Anfälligkeit kann daher die Zahl der Äzidien in einem Flecken zugrunde gelegt werden. Als schwach anfällig wird eine Sorte bezeichnet, wenn je Flecken bis 5, mäßig, wenn in einem Flecken bis 15, als stark anfällig, wenn mehr als 15 Äzidien in einem Flecken vorhanden sind.
Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Blumer, S., Beiträge zur Biologie von Diploceras hypericum (Ces.). (Ber. d. Schweiz. Botan. Gesellsch. Bd. 45. 1936. S. 321—334.)

Verf. fand 1932 oberhalb von Sigrisvil auf Stengeln von Hypericum montonum einen Pilz, der als Diploceras hypericum bestimmt wurde. Es zeigte sich, daß er auf die Gattung Hypericum spezialisiert ist. Er befällt nur die Rindenzellen des Stengels der Nährpflanze und ist als Saprophyt zu betrachten. Das Wachstum des Pilzes wurde durch Dialysate und Abkochungen von Blättern und Stengeln gefördert. Eine spezifische Wirkung von Hypericum Dialysaten war nicht festzustellen. Er gedieh auf vielen Kohlehydraten und Glukosiden und sogar auf Kork. Verschiedene Glukoside sind für den Pilz ausgezeichnete Kohlenstoffquellen. Als beste Stickstoffquelle erwies sich Pepton. Diploceras bildet in flüssigen Medien Gemmen.
Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Bockmann, H., Der gegenwärtige Stand der Forschungen über die Fußkrankheiten des Getreides. (Nachrichtenbl. f. d. Deutschen Pflanzenschutzdienst. Bd. 16. 1936. S. 57—58.)

In Deutschland treten vorwiegend 2 Arten von Fußkrankheiten auf: die durch Ophiobolus graminis Sacc. verursachte Schwarzbeinigkeit und die durch Cercosporella herpotrichoides Fron hervorgerufene Halmbruchkrankheit. Ophiobolus graminis befällt vornehmlich die Wurzeln der Pflanzen. Anfällig sind in erster Linie Weizen und Gerste. Roggen leidet nur schwach. Hafer ist praktisch widerstandsfähig. Die Aussaatzeit ist insofern von Bedeutung, als spät bestellte Saaten weniger durch die Krankheit gefährdet sind als früh bestellte. Das Auftreten der Schwarzbeinigkeit wird weitgehend von der Güte des Bodens beeinflußt. Die unterschiedliche Schutzwirkung der Böden ist durch den verschiedenen Gehalt an Mikroorganismen, vornehmlich Bakterien, bedingt. Von der Düngung scheint die Krankheit nicht abhängig zu sein. Auch der Kalkgehalt und die p_H-Zahl des Bodens scheinen keine Rolle zu spielen. Wenn auch durch eine geregelte Fruchtfolge, durch späte Aussaat und sorgfältige Bodenpflege größere Schäden verhütet werden können, so ist doch ein durchschlagender Erfolg damit nicht verbürgt.

Cercosporella herpotrichoides befällt nur den Halmgrund. Befallen werden ebenfalls in der Hauptsache Weizen und Gerste. Roggen ist schwächer und Hafer nur ganz schwach anfällig. Wie bei der Schwarzbeinigkeit leiden früh bestellte Schläge am meisten. Klare Beziehungen zwischen Auftreten der Halmbruchkrankheit und Nährstoff- und Kalkgehalt des Bodens bestehen nicht. Die Güte des Bodens scheint keinen unmittelbaren Einfluß auf die Halmbruchkrankheit zu haben. Zur Verhütung der Krankheit ist eine geregelte Fruchtfolge besonders wichtig.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Böning, K., Maßnahmen zur Bekämpfung des Wildfeuers an Tabak. (Deutsch. Landw. Presse. 63. Jahrg. 1936. S. 261—262, 4 Abb.)

Verf. bespricht eingehend die Maßnahmen, die zur Bekämpfung der Wildfeuerkrankheit des Tabaks erforderlich sind. Für die Bekämpfung der Krankheit ist die Heranzucht gesunder Sämlinge in den Saatbeeten und die Auspflanzung völlig einwandfreier Setzlinge die grundlegende Maßnahme. Die Bodenentseuchung kann zwar mit Formalin und bekannten Beizmitteln vorgenommen werden, doch muß mit der Aussaat nach der Behandlung einige Zeit gewartet werden. Da das vielfach nicht möglich ist, empfiehlt Verf., in diesen Fällen die Sämlinge, sobald sich die Keimblätter voll entfaltet haben, mit ½% Kupferkalkbrühe 1½ Liter je qm zu begießen. Stärkere Sämlinge können mit 1% Kupferkalkbrühe begossen werden. Aber auch sämtliche Teile der Anzuchtbeete müssen mit Kupferkalkbrühe bzw. Sodawasser gründlich desinfiziert werden. Das Saatgut wird zweckmäßig in 0,25 oder 0,125% Lösung von Uspulun oder Ceresan ½ Std. lang gebeizt. Vorbeugend müssen die Sämlinge mit kupferhaltigen Spritzmitteln behandelt werden. Kupferhaltige Stäubemittel haben sich ebenfalls bewährt. Jede Woche ist etwa 1 Behandlung durchzuführen. Die Bekämpfung der Krankheit auf dem Felde muß bei den Kultur- und Düngungsmaßnahmen einsetzen. Von großer Bedeutung ist die Düngung. Sie muß so eingerichtet werden, daß die heranwachsenden Pflanzen an Widerstandskraft gewinnen. Das wird am besten durch reichliche Kalizufuhr erreicht. Weiter ist die Entgipfelung von Bedeutung. Bei zu frühem und tiefem Entgipfeln wird die Empfindlichkeit erhöht. Wird die Maßnahme aber erst spät durchgeführt, so kann ein Spätbefall selbst unter ungünstigen Verhältnissen ver-

mieden werden. Öfteres Behacken übt ebenfalls einen günstigen Einfluß auf die Entwicklung der Pflanzen aus und wirkt daher dem Krankheitsbefall entgegen. Die Bekämpfung mit chemischen Mitteln ist auf dem Felde möglichst frühzeitig durchzuführen, sobald sich die ersten Anfänge der Krankheit bemerkbar machen. Nach Ansicht des Verf.s ist nicht damit zu rechnen, daß in allernächster Zeit durch Züchtung wertvolle, widerstandsfähige Sorten erhalten werden. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Wilhelm, A. F., Eine für Deutschland neue Bakterienkrankheit an Begonien. (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. Bd. 16. 1936. S. 58—60, 3 Abb.)

Verf. beschreibt eine bisher in Deutschland nicht bekannte, an Begonia elatior Clitrans Pink und B. elatior Altrichans Pink beobachtete Krankheit, die zunächst ein an Fettflecken erinnerndes Bild zeigt. Dann werden die befallenen Blatteile gelbgrün und sterben schließlich unter Braunfärbung ab. Unter günstigen Bedingungen verbreitet sich die Krankheit auf das ganze Blatt und bringt es zum Verfall. Als Erreger wurde ein Bakterium isoliert, das nach den vorläufigen Feststellungen 1,8—2,8 μ lang und etwa 0,4 μ dick ist. Es ist gramnegativ. Bei Kultur auf Bouillon-Agar bildet es einen kanariengelben, fettig glänzenden Belag. Gelatine wird verflüssigt. Künstliche Infektionen gelangen. Hohe Luftfeuchtigkeit ist für die Ausbreitung der Krankheit günstig. Um gesunde Pflanzen in der Nähe von kranken zu schützen, empfiehlt sich sorgfältiges Spritzen mit Kupferkalk- oder Kupfersodabrühe. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Oekologie, biologische und chemische Bekämpfung tierischer Schädlinge.

Börner, C. und Schilder, F. A., Die Verbreitung der Reblaus in Deutschland nach dem Stande der Jahre 1934 und 1935. (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. 15. Jahrg. 1935. S. 111—122.)

Erstmalige Neuverseuchung wurde 1934 in 34, 1935 in 51 Gemarkungen festgestellt. Die Zunahme der Reblausherde erstreckte sich besonders auf die Gebiete in Baden, Rheinhessen und an der Obermosel. Die Zahl der verseuchten Gemarkungen betrug 1935: 269. Hiervon entfallen 27 auf Seuchenherde mit Blattreblaus und 39 auf Herde mit kurzrüßligen oder Bastard-Rebläusen. Flächenmäßig stellen die unverseuchten Gemarkungen 72% der gesamten Weinbaufläche der Hauptweingebiete dar. Sehr gefährlich für die künftige Gestaltung der Reblausbekämpfung ist das Vordringen der kurzrüßligen Reblaus in den besonders in Baden noch vorhandenen größeren Beständen von Amerikanerreben. Der Wiederaufbau der entseuchten Weinbaufläche mit Pfropfreben betrug Ende 1934: 2250 ha = 2,8% der Gesamtfläche des Weinbaugebietes. Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Nitsche, G., Klee, H. und Mayer, K., Befallstärke und Ergebnisse der Bekämpfung der Rübenwanze im schlesischen Seuchengebiet 1935. II. (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. 16. Jahrg. 1936. S. 15—16.)

Durch angestellte Auszählungen wurde in den einzelnen schlesischen Kreisen eine verschieden starke Befallstärke ermittelt. U. a. ergab sich für den Kreis Guhrau ein durchschnittlicher Befall von 3% der Rüben. Durch die wiederholte Anwendung des Fangstreifenverfahrens konnte die

noch vor einigen Jahren herrschende starke Verseuchung niedergehalten und ein Ertrag geerntet werden, der gemessen an den Erträgen vor dem Auftreten der Rübenwanze z. T. nur um 10% niedriger lag.

Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Smirnov, E. und **Polejaeff, W.**, Density of population and sterility of the females in the Coccid Lepidosaphes ulmi L. (The Journ. of Animal Ecology. Vol. 3. 1934. p. 29—40.)

Für die Voraussage von Schildlausplagen ist die von den Verff. gemachte Feststellung wichtig, daß Schildläuse (die Beobachtungen wurden an Lepidosaphes ulmi gemacht), wenn die Pflanzen sehr dicht damit besetzt sind, zum Teil steril werden, so daß die betr. Schildlausbevölkerung sich nicht mehr vermehrt. Die Anzahl der unfruchtbaren Weibchen nimmt mit steigender Dichte zu. Da die Läuse in verschieden starken Gruppen zusammensitzen, so kann leicht die Fruchtbarkeit der einzelnen Gruppen verglichen werden, gemessen an der Eierzahl unter dem Schild der abgestorbenen Weibchen. K. Friederichs.

Gößwald, K., Zur Frage nach der Abhängigkeit der Entwicklung des Kiefernschwärmers Sphinx-pinastri L. von Temperatur und Luftfeuchtigkeit. (Ztschr. ang. Ent. Bd. 22. 1936. S. 521—532.)

Durch die Ergebnisse dieser Untersuchung wird zur Aufhellung wichtiger Fragen der Epidemiologie der Insektenplagen stark beigetragen. Die einseitige Beschäftigung mit den praktisch wichtigen Insekten, den Schädlingen, hat, weil diese die klimatisch sensiblen sind, zur Überschätzung der Bedeutung des Klimas und der Wetterschwankungen für den Massenwechsel im allgemeinen geführt. In Sphinx-pinastri lernen wir eine Art kennen, die sich niemals so stark vermehrt, daß sie schädlich wird, weil ihre Feinde regelmäßig in solcher Menge wirksam sind, daß nur ein kleiner Teil der Raupen dieses Schwärmers von ihnen verschont wird. Andererseits ist der Kiefernschwärmer von der Witterung unabhängig; die Sterblichkeit durch Wetterunbilden ist gleich Null. Das Fehlen klimatisch bedingter Schwankungen der Bevölkerungsdichte dieser Raupen sichert den Feinden eine konstante Nahrungsmenge, so daß sie ihrerseits ein konstantes Gegengewicht gegen die Vermehrung der Schwärmerraupen darstellen.

K. Friederichs.

Tsai Pang-Hwa and **Chang Yen-Nien**, Experimental studies regarding the influence of temperature and relative humidity on the oviposition of the Rice Weevil (Calandra oryzae L.). (Agricultura Sinica. Vol. 1 6. 1935 5. p. 175—188.)

Die Kombinationen von 24—29° C und 90—100 relat. Luftfeuchtigkeit können das „vitale Optimum" des Reiskäfers genannt werden. Die größte Beschleunigung der Eiablage erfolgt bei 26—32° C und 90—100% relat. L. Die klimatischen Bedingungen, welche die längste Lebensdauer begünstigen, liegen unter 16° und bei 85—100% r. L. Der Bereich, in dem Eiablage überhaupt stattfinden kann, liegt zwischen 10 und 35° C und 60—100% r. L. Da alle diese Werte beim Reiskäfer etwas höher liegen als beim Kornkäfer (Calandra granaria), so ist erstere Art in südlichen Ländern reichlicher vertreten als die letztere. Man kann aus den angegebenen Werten

schließen, daß das Auftreten des Reiskäfers in Lagerhäusern ganz vermieden werden kann, wenn die Temperatur niedriger als 10° oder höher als 35° gehalten wird oder die Luftfeuchtigkeit niedriger als 60%.

K. Friederichs.

Speyer, W., Syrphidenlarven als Blutlausfeinde. (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. 16. Jahrg. 1936. S. 16.)

Schwebfliegenlarven halten sich gelegentlich auch in Blutlauskolonien auf. An der Niederelbe wurden bisher folgende Arten festgestellt: Syrphus ribesii L., Epistrophe balteata Deg. und Pipiza dubia Lund. Da die Syrphiden mehrere Generationen erzeugen und der Nahrungsbedarf ihrer Larven sehr erheblich ist, scheinen sie auch den Massenwechsel der Blutlaus zu beeinflussen. Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Voute, A. D., Cryptorrhynchus gravis F. und die Ursachen seiner Massenvermehrung in Java. (Arch. Neerland. Zool. T. 2. 1935. p. 112—142.)

Die Mangafrüchte werden im westlichen Teil Javas großenteils von dem Rüßler C. gravis befallen, der sich vollständig bis zur Imago darin entwickelt und dann erst die Frucht verläßt. Große Trockenheit kann der junge Käfer nicht vertragen, daher erlaubt das Klima Ostjavas seine Existenz daselbst i. a. nicht. An gewissen Stellen der Insel bringen Chinesen Nester der Weberameisen in die Bäume und schützen dadurch die Früchte. Die Ameisen können die Käfer nicht töten, vertreiben sie aber. Einzelheiten über die Art, wie die Ameisen gegen die Käfer mobil gemacht werden können, sowie Genaues über die Lebensweise, Vermehrung usw. des Käfers werden berichtet. K. Friederichs.

Malenotti, E., Un problema di estetica montana : la Coleophora del Larice. (Atti Accad. Agric. Sci. e Lett. Verona. Ser. 5. Vol. 13. 1935. p. 153—158.)

Da die von Coleophora laricella stark befallenen Lärchen die Schönheit des Landschaftsbildes in den italienischen Alpen stark beeinträchtigen, so wird mit Rücksicht auf den Reiseverkehr eine winterliche Spritzung mit 5% Neodendrin zur Abtötung der an den Zweigen überwinternden Raupen der Miniermotte empfohlen. Kosten: 1 Lira je Baum.

K. Friederichs.

Malenotti, E., La Tignola orientale del Pesco (Laspeyresia molesta Busck.) a Verona. (Atti Accad. Agric. Sci. e Lett. Verona. Ser. 5. Vol. 12. 1934. p. 145—151.)

Der Schmetterling (Wickler) Laspeyresia molesta (wahrscheinlich in Ostasien beheimatet) ist in Italien als Schädling der Pfirsiche schon 1902 aufgetreten und ist jetzt daselbst stark verbreitet. Verf. fordert zum Kampf gegen diesen nicht zu unterschätzenden Schädling auf, indem er Beispiele anführt, daß da, wo die befallenen Triebe wiederholt beseitigt seien, mit verhältnismäßig geringem Aufwand ein mindestens zehnfach höherer Schaden habe vermieden werden können. Gegebenenfalls werde die Bekämpfung zur Pflicht gemacht werden müssen. K. Friederichs.

Eidmann, H., Ein neues Kontaktgift gegen die Nonne. (Ztschr. Forst- u. Jagdwesen. 1936. Sonderabdr. 20 S.)

Während bisher ein geeignetes Kontaktgift gegen die Nonne und andere

behaarte Raupen nicht zur Verfügung stand, hat nunmehr die Firma E. Merck in Darmstadt ein solches Mittel, das Detal, herausgebracht. Bei einem größeren Freilandversuch in der Rominter Heide zeigte sich, daß 25 kg, auf 1 ha gestäubt, die Raupen des 3. Stadiums innerhalb von 2 Tagen restlos abtötete. Blätter der Laubhölzer und junge Triebe der Nadelhölzer leiden durch den Giftstaub, doch kann diese vorübergehende Schädigung der Neutriebe der Kiefer unbedenklich gewagt werden. Schädigung von Warmblütern, die etwa Detal mit der Nahrung aufnehmen, ist Versuchen nach unwahrscheinlich; auch verliert der Staub durch Zersetzung seine Giftigkeit längstens 2 Tage nach der Bestäubung. K. Friederichs.

Verschiedenes.

Huß, H., Das innere Wesen der diskontinuierlichen Sterilisation. (Einige orientierende Versuche.) (Ztschr. f. Hyg. u. Infktionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 370—385.)

Es wird im allgemeinen angenommen, daß der Effekt der diskontinuierlichen Sterilisation darauf beruht, daß die bei der ersten Erhitzung nicht getöteten Bakteriensporen in den Pausen, die zwischen den Wärmebehandlungen eingeschaltet werden, zu Oidien auskeimen, die bei der folgenden Erhitzung getötet werden. Diese Annahme gilt jedoch nur für bestimmte Verhältnisse; denn nach den Untersuchungsergebnissen Verf.s bilden die erhitzten Sporen in den Zwischenzeiten durchaus nicht immer Keimstäbchen. Die Sporenkeimung hängt ab von der Zwischenzeittemperatur und von der Zwischenzeitdauer. Verf. hält es für unwahrscheinlich, daß die Keimstäbchenbildung eintritt, wenn die Zwischenzeitdauer — wie gewöhnlich — nur 24 Std. beträgt und die Temperatur, bei der die zu sterilisierenden Objekte aufbewahrt werden, unter 30° liegt. Es erscheint sogar fraglich, ob hierfür die Temperatur von 30° immer genügend hoch ist. Bei 37° findet Oidienbildung innerhalb von 24 Std. statt. Diese Zeitdauer dürfte in vielen Fällen sogar etwas zu reichlich bemessen sein; die neugebildeten Oidien bringen bereits wieder Sporen hervor, wodurch der gewünschte Effekt aufs Spiel gesetzt wird. Der Sterilisationseffekt wird andererseits fast derselbe, wenn die Objekte bei 0° oder 20° in der Zwischenzeit gehalten werden. Durch wiederholte Erhitzungen an ein und demselbem Tag ist es — unabhängig von der Zwischenzeittemperatur — möglich, Nährböden (Milch) steril zu erhalten.

Der Sterilisationseffekt muß demnach verschiedene Ursachen haben. Bei niederer Zwischenzeittemperatur werden die Sporen in der Regel mehr oder weniger anschwellen, ihre Membran wird wasserreicher und hierdurch lockerer, für die Wärme leichter zu durchdringen. Bei höherer Temperatur beginnen die Sporen mit dem Keimungsprozeß; dieser wird jedoch durch die nach der abgelaufenen Zwischenzeit einsetzende Erhitzung abgebrochen. Die angekeimten Sporen werden durch die Wärme getötet oder zu sehr geschädigt, um in der folgenden Zwischenzeit Oidien bilden zu können. Bei noch höherer Temperatur keimen die Sporen zu Stäbchen aus, die bei der nachfolgenden Erhitzung vernichtet werden. Sicherlich kommt es auch oft vor, daß von den Sporen einige, unabhängig von der obwaltenden Temperatur, in den Zwischenzeiten überhaupt nicht keimen, sondern während der Erhitzung stufenweise geschädigt bzw. getötet werden, während gleichzeitig andere Sporen Oidien bilden oder zu keimen anfangen, wodurch sie leichter durch die Wärme getötet werden. Je näher die Zwischenzeittemperatur der für die Keimung der Sporen optimalen liegt, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit dafür, daß der Effekt der diskontinuierlichen Sterilisation größtenteils auf Tötung voll ausgebildeter Oidien beruht. Je mehr die Zwischenzeittemperatur sich aber von diesem Optimum entfernt, desto sicherer erscheint es, daß die anwesenden Sporen ohne vorherige Oidienbildung bei den wiederholten Erhitzungen allmählich zugrunde gehen.

Das in der Regel sicherste Verfahren besteht nach den Erfahrungen Verf.s darin, daß man eine Zwischenzeittemperatur von 15—30° und eine Zwischenzeitdauer von etwa 24 Std. wählt. Diese Zwischenzeittemperatur bzw. Zwischenzeitdauer hat vor der Temperatur von 37° bzw. einer längeren Zwischenzeitdauer den Vorteil, daß gegebenenfalls gebildete Oidien nicht die erforderliche Zeit zum Sporulieren finden.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Desinfektionsmittel. Dr. **Paul Flemming**, Hamburg. DRP. 625609, Kl. 30 i, Zus. zu DRP. 610 498.

Es hat sich gezeigt, daß in dem aus DRP. 610 498 bekannten, aus einem Gemisch von Chlorthymol mit Chlorxylenol und / oder Chlorkresol bestehenden Desinfektionsmittel das Chlorthymol mit Vorteil durch Thymol ersetzt werden kann. Abgesehen von der größeren Desinfektionswirkung des neuen Mittels haben die mit Thymol hergestellten Zubereitungen den Vorteil der höheren Löslichkeit und des besseren Geruchs.

Schütz (Berlin).

Salzer, F., Über den Einbau von schwerem Wasserstoff in wachsende Organismen. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 325—326.)

Bei der Aufnahme von schwerem Wasserstoff beim autotrophen und heterotrophen Wachstum von Pflanzen in Nährlösungen mit schwerem Wasser muß man zwischen dem nicht auswaschbaren schweren Wasserstoff, den man als eingebaut bezeichnet, und dem auswaschbaren oder austauschbaren schweren Wasserstoff unterscheiden. Sowohl bei Grünalgen als bei Pilzen wurde ein Einbau festgestellt. Auch bei Hefe liegt ein Einbau vor. Man ließ Hefe in 40—50 proz. schwerem Wasser, dem Nährsalze und Rohrzucker zugesetzt waren, wachsen. Der Quotient aus dem D-Gehalt des Wasserstoffs in der mit gewöhnlichem Wasser ausgewaschenen und getrockneten Hefe und dem D-Gehalt des Wasserstoffs des Wuchswassers betrug etwa 0,42, ähnlich wie bei Pilzen. Man isolierte aus der Hefe Eiweiß bzw. Aminosäuregemisch, Glykogen und die Zellwandsubstanz und ermittelte den D-Gehalt des Wasserstoffs der Aminosäuren zu 11%, des Glykogens zu 3% und der Zellwandsubstanz zu 15%. Der Unterschied im D-Gehalt der beiden Kohlenhydrate ist auf eine verschiedene physiologisch-chemische Entstehungsgeschichte zurückzuführen. Henß (Berlin).

Carbone, D., et **Alexandri, Al. V.**, Recherches sur les anticorps chez les végétaux. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 221—223.)

In Übereinstimmung mit anderen Autoren konnten die Feststellungen Frémonts, wonach Pflanzen Agglutinine und Präcipitine zu bilden imstande sind, nicht bestätigt werden. Bortels (Berlin-Dahlem).

Nicol, Hugh, The derivation of the nitrogen of crop plants, with special reference to associated growth. (Biol. Reviews. Vol. 9. 1934. p. 383—410.)

Diese Zusammenstellung beginnt mit einem Überblick über die Frage der mineralischen Ernährung der Pflanzen: Verf. glaubt nicht, daß das Nitrat die einzige N-Quelle sei, die die Pflanzen aufnehmen. Später geht Verf. zur Betrachtung verschiedener Arbeiten über Mischkulturen von Leguminosen und Nicht-Leguminosen über, aus denen hervorgeht, daß sich wahrscheinlich die Nicht-Leguminosen von N-Verbindungen ernähren, die aus den Leguminosen diffundieren. Es sind Tabellen beigegeben, worin alle diese veröffentlichten Versuche erörtert sind. Die Namen von J. G. Lipman, Virtanen und seinen Mitarbeitern in Finnland, sowie Rothamsted sind hier zu nennen, auch die Pionierarbeiten von Pilz sowie Kaserer in Österreich sind nicht zu vergessen. In einer kurzen Notiz wird auch auf die pflanzlichen Wuchsstoffe eingegangen, wobei Verf.

den Leguminosen eine besondere Rolle in der Fruchtfolge zuschreibt. 115 Literaturtitel aus 15 Ländern sind angegeben.

Autorreferat (Rothamsted).

Kutepou, A., Beitrag zur Kenntnis der Atmungsvorgänge an Reinkulturen höherer Pflanzen. (Diss. Verlag K. Triltsch, Würzburg. 1934. 44 S.)

Verf. stellte Versuche mit sterilen ausgekeimten Pflanzen von Helianthus annuus und Zea Mays an, die bezweckten, festzustellen, ob und in wie weit eine Beeinflussung der Ergebnisse der aeroben und anaeroben Atmung an höheren Pflanzen durch die Mikroorganismenatmung zustande kommt. Versuchsergebnisse: 1. die Ergebnisse sämtlicher aerober und anaerober an Mais- und Sonnenblumenkeimlingen ausgeführten Atmungsversuche wurden durch die Atmung anhaftender Mikroorganismen beeinflußt; 2. der Einfluß von Mikroorganismen erstreckt sich nicht nur auf die Kohlensäurewerte, sondern auch auf die Sauerstoffwerte; 3. der Einfluß von Mikroorganismen auf die Atmungswerte kann bei derselben Pflanzenart und unter den gleichen Versuchsbedingungen verschieden groß sein.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Schopfer, W. H., Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Recherches sur la solubilité des facteurs de croissance. Le facteur de l'urine. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 290—308.)

Im Urin findet sich ein Stoff, der als Wachstumsfaktor für vegetative Entwicklung und Zygotenentwicklung von Phycomyces blakesleeanus wirkt. Er kann auch durch Chloroform extrahiert werden und ist wahrscheinlich identisch mit dem Stoff, der aus dem eingetrockneten Rückstand des Urins durch Wasser und Alkohol gewonnen werden kann.

Die naheliegende Annahme, daß es sich um Vitamin B 1 handele, dessen Wirkung in reiner Form auf diesen Organismus festgestellt ist, stößt wegen der Löslichkeit in Chloroform auf Schwierigkeiten, da das Vitamin darin unlöslich sein soll. Immerhin würde auch eine sehr geringe Löslichkeit das Eintreten der Wirkung ermöglichen. Sonst müßte man das Vorhandensein eines neuen, vom Vitamin B 1 verschiedenen Faktors annehmen. Ähnliche Schwierigkeiten ergeben sich aus der Betrachtung der Wirkung von Weizenkeimen und Reiskleie, die mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelt werden.

Die Wirkung auf die Sexualität erscheint nicht unmittelbar, sondern mittelbar über die Kräftigung der vegetativen Entwicklung, wodurch die Bildung der sexualspecifischen Stoffe begünstigt wird.

Rippel (Göttingen).

Abgeschlossen am 14. September 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 95. No. 9|12.
Ausgegeben am 2. November 1936.

Nachdruck verboten.

Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und anderen Erdaschenstoffen für stickstoffbindende und andere Mikroorganismen.

[Aus der mikrobiologisch-chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.]

Von **H. Bortels.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen waren die bekannten Tatsachen, daß fruchtbare Böden sehr reich an Azotobakter sind, so daß der Azotobakter-Gehalt eines Bodens seit Beijerinck (1922) und Winogradsky (1926) als ein Kriterium für seine Fruchtbarkeit angesehen wird, und ferner daß Azotobakter in synthetischen Nährlösungen mit allen bisher als notwendig erkannten Nährstoffen einschließlich Kalzium und Eisen nur nach Zugabe geringer Mengen fruchtbaren Bodens nennenswerte Stickstoffmengen zu binden vermag (Krzemieniewski 1909, Heinze 1926). Es ergab sich dann zunächst, daß die Aschen von Erdextrakten in ähnlicher Weise wirkten wie diese selbst. Folglich wurde angenommen, daß an der Ursache für den Azotobakter-Reichtum gewisser Böden irgendwelche anorganischen Bestandteile derselben maßgeblich beteiligt sein müßten, die in den üblichen mineralischen Düngemitteln nicht, sondern höchstens in organischem Dünger wie Stallmist in ausreichender Menge vorhanden sind (Bortels 1929, 1934). In dieser Annahme wurde ich 1930 durch die Feststellung bestärkt, daß Verbindungen des Molybdäns das Wachstum von A. chroococcum in stickstofffreier Nährlösung sehr stark fordern und daß dieses Element, wie etwas später ermittelt wurde (1933), nur durch Vanadium bis zu einem gewissen Grade ersetzt werden kann. Damit waren Molybdän und Vanadium als vermutlich bedeutsame Faktoren der Bodenfruchtbarkeit anzusehen.

Zur Gewißheit ist diese Vermutung geworden, nachdem die Analysen von Ter Meulen (1931, 1932, 1932) und Konishi und Tsuge (1933, 1934) bewiesen haben, daß stickstoffbindende Organismen mehr Molybdän enthalten als andere und fruchtbarere Böden mehr Molybdän und mehr Vanadium als weniger fruchtbare. Iwasaki (1930) und später auch noch Burk, Lineweaver und Horner (1932) haben allerdings den Standpunkt vertreten, daß Bodenhumus und somit auch seine Asche die Stickstoffbindung nicht fördere, sondern nur das Wachstum, was auf dem Eisengehalt des Humus beruhe, obwohl ja Eisen gewöhnlich in ausreichender Menge gegeben wird. Birch-Hirschfeld (1932) aber, die als eine der ersten die in der Mitteilung über „Molybdän als Katalysator

der biologischen Stickstoffbindung" veröffentlichten Ergebnisse nachgeprüft hat, konnte sie bestätigen und durch die Entdeckung erweitern, daß außer der Asche eines fruchtbaren Bodenhumus auch sein organischer Anteil auf das Azotobakter-Wachstum in synthetischer Nährlösung fördernd einwirkt. Dieser soll jedoch nicht für die Stickstoffbindung notwendig sein, sondern nur das Wachstum beschleunigen. Das steht in gutem Einklang mit den Beobachtungen Schröders (1932), Rippels (1936) und anderer, wonach verschiedene kolloidale Substanzen Azotobakter im Wachstum fördern. Eine weitere Bestätigung der Molybdänwirkung kam 1933 von Kluyver und van Reenen, die außerdem die Gültigkeit dieser Beobachtung auch für A. agilis[1]) und A. Beijerinckii nachweisen konnten.

Wenn es mir selbst erst jetzt nach mehreren Jahren möglich ist, nähere Einzelheiten und ausführlicheres Zahlenmaterial zu den Feststellungen über die Molybdän- und Vanadiumwirkung zu bringen, während sie doch von verschiedenen anderen Autoren schon nachgeprüft, bestätigt und erweitert werden konnten, so ist der Grund hierfür in erster Linie darin zu erblicken, daß bereits nach den ersten Versuchen über die Molybdänwirkung ein weiterer, gänzlich anderer Faktor von ausschlaggebender Bedeutung für die biologische Stickstoffbindung entdeckt wurde, der zur jeweilig herrschenden Witterung in Beziehung steht. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, diesen Faktor erst einmal näher kennen zu lernen, damit er bei den Arbeiten über Molybdän, Vanadium und Wolfram die gebührende Berücksichtigung finden konnte. Eine vorläufige Mitteilung über die gemeinsam mit C. Stapp durchgeführten Untersuchungen über diesen Faktor, der hier kurz als We-Faktor bezeichnet wird, ist kürzlich in dieser Zeitschrift veröffentlicht worden (Stapp und Bortels 1936). Wegen dieses neuen, vorläufig noch nicht konstant zu haltenden Einflusses auf Azotobakter hat es sich als notwendig herausgestellt, die Zeiten, zu denen die folgenden Versuche ausgeführt wurden, jeweils anzugeben. Die manchmal deutlich voneinander abweichenden Werte können deshalb auch nicht unmittelbar ohne Rücksicht auf die zugehörige Wetterlage miteinander verglichen werden.

Die experimentelle Bearbeitung der Fragen nach der Wirkung des Molybdäns, Vanadiums und auch des Wolframs und der Erdextraktasche wurde an je einem Stamm von A. chroococcum und A. vinelandii durchgeführt, die beide sehr intensiv Stickstoff binden[2]), vornehmlich aber an A. chroococcum. Daneben wurden auch noch andere Mikroorganismen zu den Versuchen herangezogen, besonders ein Stamm von Bac. amylobacter. Die Impfkulturen der beiden Azotobakter-Arten auf Möhrenagar waren nie älter als 7 Tage.

Die Kulturen wurden, wenn nichts anderes ausdrücklich erwähnt ist, immer bei 29° C in 200 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Geräteglas Nr. 20 in 25 ccm folgender Grundnährlösung kultiviert:

Aqua dest. 100; K_2HPO_4 0,1; $CaCO_3$ 0,1; $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,05; $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ ca. 0,0001.

Als Kohlenstoffquelle dienten entweder 2% Mannit oder 2% Glukose.

[1]) Kluyver und van Reenen haben den von mir aus einer älteren Sammlung als A. agile übernommenen Stamm als A. vinelandii identifiziert. In meiner 1. Mitteilung (1930) ist darum dieser selbe Stamm als A. agile, in der vorliegenden dagegen als A. vinelandii erwähnt.

[2]) Bekanntlich trifft das durchaus nicht für alle Stämme zu. Dianowa und Woroschilowa (1931) berichteten sogar von solchen, die angeblich gar keinen Stickstoff binden (siehe auch Tab. 2).

Bei der analytischen Auswertung der Versuche wurde gewöhnlich der Gesamtstickstoff nach K j e l d a h l bestimmt. Die Nährlösung mit den Bakterien wurde nach Ansäuern mit 1 ccm konz. Schwefelsäure quantitativ in einen 100 ccm fassenden K j e l d a h l - Kolben übergespült, mit Siedesteinchen auf offener Flamme eingedampft bis zur Bildung von Schwefelsäuredämpfen und dann nach Zusatz von 4 ccm rauchender Schwefelsäure aufgeschlossen. Dabei fand als Katalysator das Reaktionsgemisch nach W i e n i n g e r (1933) Verwendung, das aus Selen, Kupfersulfat, Quecksilbersulfat und Natriumsulfat besteht. Nach Verdünnung mit H_2O und Anschluß des Kolbens an die Destillationsapparatur wurde mit 20 ccm Natronlauge, spez. Gew. 1,35, und 5 ccm 4 proz. Kaliumsulfidlösung alkalisiert. Die Apparatur war die nach M i c h a e l i s (1926) in etwas abgeänderter Form. Es wurde nicht im Wasserdampfstrom destilliert, sondern auf gewölbtem Asbest-Drahtnetz über der Bunsenflamme. Um ein Zurücksteigen von Flüssigkeit aus der Vorlage zu verhindern, mußte mit einer kleinen Motorluftpumpe ein schwacher, in verdünnter Schwefelsäure gewaschener Luftstrom durch die Apparatur gedrückt werden. Als Vorlage diente eine ausreichende Menge Borsäure, in der das Ammoniak mit $^1/_{50}$ n Schwefelsäure und Methylrot titriert wurde.

Die in den Tabellen aufgeführten Analysenwerte zweier Parallelen beziehen sich nicht auf zwei Parallelbestimmungen einer Kultur, sondern auf je eine Bestimmung zweier Parallelkulturen. Unterschiede in den Parallelen beruhen nicht auf Analysenfehlern, wie verschiedentlich durch Kontrollanalysen festgestellt wurde, sondern auf ungleichem Wachstum in den beiden Parallelkulturen. Als Blindversuche wurden Kulturen analysiert, die in gleicher Weise wie die anderen beimpft, dann aber mit Sublimat sofort wieder sterilisiert worden waren.

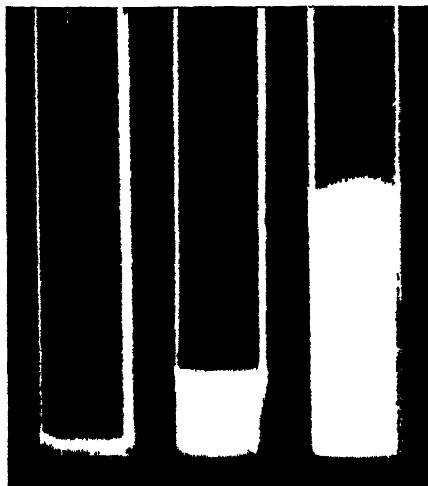


Abb. 1. Sedimente[1]) von A. c h r o o c o c c u m aus je 100 ccm Mannit-Nährlösung. 1932. Von links nach rechts: Ohne Zusatz; + 0,0005% $NaVO_3$; + 0,0005% Na_2MoO_4.

I. Über die Wirkung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und Erdextraktasche auf das Azotobakter-Wachstum in stickstofffreier Nährlösung.

Zur Bekräftigung dessen, was in den früheren Mitteilungen (1930, 1933) schon gesagt wurde, sollen zunächst einige Versuche Erwähnung finden, die die grundlegende Beobachtung erneut bestätigen, daß der hier verwendete Stamm von A. c h r o o c o c c u m unter den obwaltenden Versuchsbedingungen keine nennenswerten Stickstoffmengen bindet, wenn in der Nährlösung Molybdän oder Vanadium oder Erdextraktasche fehlt[2]).

[1]) 100 ccm bewachsener Kulturlösung wurden mit 20 ccm roher konzentrierter Salzsäure und 50 ccm dest. Wassers versetzt und gekocht bis zur gleichmäßig feinen Zerteilung der Bakterienmasse. Nach mehrstündigem Absitzenlassen, Abgießen der überstehenden Flüssigkeit und Überführen des Sediments in die völlig gleichen Sedimentierröhren wurde nach weiteren 48 Std. photografiert.

[2]) Wenn B u r k 1934 mitteilt, daß erst seine und seiner Mitarbeiter Untersuchungen den Beweis für die fördernde Wirkung des Molybdäns auf das A z o t o b a k t e r - Wachstum in stickstofffreier Nährlösung erbracht hätten, weil niedere Molybdänkonzentrationen noch nicht untersucht worden seien und der Einfluß von 0,0005% Natriummolybdat auch auf die mögliche Wirkung einer Verunreinigung hätte zurückgeführt werden können, so dürfte eine solche Äußerung wohl nicht berechtigt sein. Denn schon 1930 ist in der damaligen ersten Mitteilung erwähnt worden, daß bereits Konzentrationen um 0,00001% Natriummolybdat (selbstverständlich wurde ein

Tab. 1. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 24.—30. 12. 1935.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Steril	0,3	0,3
Ohne Zusatz	1,1	1,1
+ 0,00001% $NaVO_3$	12,8	14,8
+ 0,001% Na_2MoO_4	29,3	29,2
+ { 0,00001% $NaVO_3$ / 0,001% Na_2MoO_4 }	29,3	29,9

Mit Rücksicht auf die im Impfgut und in der Nährlösung wahrscheinlich noch enthaltenen geringen Spuren von Molybdän oder Vanadium muß das eine oder das andere dieser Elemente als unentbehrlich angesehen werden für das Wachstum in synthetischer stickstofffreier Nährlösung und somit auch praktisch für die Stickstoffbindung wenigstens dieses Stammes von A. chroococcum. Ferner geht aus Tab. 1 hervor, daß Molybdän und Vanadium vereint nicht stärker fördernd wirken als Molybdän allein, und daß die Wirkung des Vanadiums geringer ist als die des Molybdäns. Diese Beobachtungen sowie auch die Feststellung, daß die beiden Elemente Molybdän und Vanadium durch kein anderes vertretbar sind (1928—1930 wurden über 40 Elemente geprüft), konnten inzwischen von Burk und Mitarbeitern (1934, 1935) bestätigt und insoweit noch erweitert werden, als unteroptimale[1]) Konzentrationen von Molybdän und Vanadium sich in ihrer Wirkung ergänzen sollen. Es muß jedoch betont werden, daß die Feststellung dieser Autoren, die optimale[1]) Vanadiumwirkung betrage bei dem von ihnen benutzten Stamm von A. vinelandii ziemlich konstant („rather constantly") 70% derjenigen des Molybdäns, nicht zu verallgemeinern ist. Offenbar wechselt die Größe dieses Verhältnisses mit dem Wechsel in den verwendeten Azotobakter-Stämmen und in der Wirkungsweise des bis jetzt nicht kontrollierbaren We-Faktors. Ein Vergleich zwischen dem in den übrigen Versuchen dieser Mitteilung ausschließlich benutzten Stamm R_1 mit anderen Stämmen von A. chroococcum läßt deren unterschiedliches Verhalten deutlich erkennen.

Tab. 2. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung in 150 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben. 15.—20. 5. 1936.

Stämme von A. chroococcum	mg N in 100 ccm Nährlösung					
	ohne Zusatz		+ 0,00008% $NaVO_3$		+ 0,001% Na_2MoO_4	
BG_3	0,7	0,7	1,2	1,2	1,5	1,3
M	1,0	0,8	1,5	1,5	1,9	2,0
G	1,1	1,1	4,4	3,9	8,4	8,0
R_1	0,8	1,0	9,0	11,1	15,7	15,9

reines Salz verwendet!) auf das Azotobakter-Wachstum in stickstofffreier Nährlösung fördernd wirken, daß mit 0,00005% schon das Optimum erreicht ist, und daß A. vinelandii schon auf den Zusatz von 0,000005% reagiert. Hier können doch unmöglich Verunreinigungen als wirksame Faktoren angesehen werden! 1933 wurde dann ferner mitgeteilt, daß auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse (von einer Veröffentlichung wurde wegen des noch ungeklärten Einflusses des We-Faktors abgesehen) geschlossen werden müsse, daß Azotobakter ohne Molybdän oder Vanadium keine nennenswerten Stickstoffmengen zu binden vermag.

[1]) Siehe Abschnitt II.

Viel größer noch als die Schwankungen im Verhältnis der Vanadiumwirkung zur Molybdänwirkung sind die Unterschiede in der absoluten Höhe der Stickstoffbindung bei den verschiedenen Stämmen. In diesem Umstande wird einer der Gründe zu suchen sein, weshalb verschiedene Forscher bei ihren Versuchen über die Stickstoffbindung zu abweichenden Ergebnissen kommen konnten. Ganz besonders ist diese Möglichkeit gegeben, wenn nicht nur mit verschiedenen Stämmen einer Art, sondern mit verschiedenen Arten gearbeitet wurde, wie auch andere Methoden und nicht zuletzt auch der bislang unbekannte, zu verschiedenen Zeiten und an verschiedenen Orten verschieden wirksame We-Faktor zu anderen Feststellungen und mitunter sogar zu Trugschlüssen führen konnten.

Ein ähnlicher Einfluß, wie ihn Vanadium auf das Azotobakter-Wachstum in stickstofffreier Nährlösung ausübt, geht von Erdextraktasche[1]) aus, deren Wirkung, soweit Untersuchungen mit verschiedenen Böden ausgeführt wurden, auch nicht an die des Molybdäns heranreicht.

Tab. 3. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 2.—8. 3. 1933.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Steril	0,5	0,5
Ohne Zusatz	1,6	1,7
+ 0,0005% $NaVO_3$	4,4	5,1
+ Erdextraktasche	9,2	10,6
+ 0,0005% Na_2MoO_4	26,2	27,4

Welche Stoffe in der Erdextraktasche wirksam sind, ist nicht ohne weiteres zu entscheiden. Jedenfalls kommen hier auch wohl Spuren von Molybdän und Vanadium in Frage. Wolfram, das in der ersten Mitteilung über Katalyse der biologischen Stickstoffbindung schon erwähnt worden ist als ein Element, das diesen Vorgang kaum oder gar nicht zu fördern vermag, hat dagegen andere Funktionen, die weiter unten besprochen werden sollen. Es vermag ebensowenig wie Vanadium, weder allein noch in Gemeinschaft mit diesem, die Wirkung optimaler[2]) Molybdän-Konzentrationen zu steigern (Tab. 4 u. 6).

Tab. 4. Azotobacter chroococcum in Mannitnährlösung. 15.—19. 1. 1935.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Steril	0,5	0,5
Ohne Zusatz	2,0	2,0
+ 0,00042% Na_2WO_4	4,4	4,4
+ 0,0009% $NaVO_3$	11,0	11,3
+ 0,0005% Na_2MoO_4	15,1	16,4
+ {0,00017% Na_2WO_4, 0,00036% $NaVO_3$, 0,0002% Na_2MoO_4}	14,3	14,7

[1]) 10 g fruchtbaren, feingesiebten Bodens wurden mit 20 ccm Leitungswasser ½ Std. bei 2 Atmosphären im Autoklaven erhitzt. Die überstehende Flüssigkeit wurde dann abgegossen, in der Quarzschale eingedampft und verascht. Die Asche wurde nach Neutralisation mit verdünnter H_2SO_4 in 50 ccm Nährlösung aufgenommen.

[2]) Siehe Abschnitt II.

Die geringe Erhohung des Stickstoffgewinns durch Wolfram, die mitunter beobachtet werden kann, ist beachtenswert im Hinblick auf den später zu besprechenden Einfluß dieses Elementes auf die Assimilation gebundenen Stickstoffs sowie auch im Hinblick auf die eigenartige Erscheinung, daß die Wirkung unteroptimaler[1]) Molybdän-Konzentrationen und sowohl unteroptimaler[1]) als auch optimaler[1]) Vanadium-Konzentrationen durch Wolfram erhöht wird. Hieraus muß in bodenkundlicher Hinsicht der Schluß gezogen werden, daß möglicherweise ein molybdänfreier und vanadiumarmer Boden dennoch beachtliche Mengen Stickstoff binden kann, wenn er außerdem Wolfram enthält, wenngleich intensivste Stickstoffbindung immer nur in molybdänhaltigen Böden stattfinden wird.

Die folgenden Tabellen geben über die Wirkung verschiedener Kombinationen von Molybdän, Vanadium und Wolfram Aufschluß und bieten zugleich einen etwas tieferen Einblick in die Wirkungsweise der Erdextraktasche, die offenbar nicht nur wegen ihres möglichen Gehalts an Salzen des Molybdäns, Vanadiums und Wolframs die Stickstoffbindung fördert, sondern darüber hinaus noch in anderer Weise das Azotobakter-Wachstum begünstigen muß. Anderenfalls wäre es auf Grund der mit den verschiedenen

Tab. 5. Azotobacter chroococcum in Glukosenahrlosung. 16.—20. 3. 1936.

Nahrlosung	mg N in 100 ccm	
+ 0,00002% $NaVO_3$	3,4	5,3
+ {0,00002% $NaVO_3$ / 0,0004% Na_2WO_4}	7,6	8,3
+ 0,001% Na_2MoO_4	14,3	14,5
+ {0,001% Na_2MoO_4 / Erdextraktasche}	26,9	27,3

Tab. 6. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlosung. 30. 3.—3. 4. 1936.

Nahrlosung	mg N in 100 ccm	
Ohne Zusatz	0,9	0,9
+ 0,001% Na_2MoO_4	20,1	20,6
+ 0,00002% $NaVO_3$	3,4	3,5
+ 0,0004% Na_2WO_4	1,0	1,0
+ {0,001% Na_2MoO_4 / 0,00002% $NaVO_3$}	16,5	20,2
+ {0,001% Na_2MoO_4 / 0,0004% Na_2WO_4}	19,9	19,9
+ {0,00002% $NaVO_3$ / 0,0004% Na_2WO_4}	11,2	11,9
+ {0,001% Na_2MoO_4 / 0,00002% $NaVO_3$ / 0,0004% Na_2WO_4}	15,6	19,3
+ Erdextraktasche	5,7	7,5
+ {0,001% Na_2MoO_4 / Erdextraktasche}	24,8	24,6
+ {0,00002% $NaVO_3$ / Erdextraktasche}	13,3	15,7
+ {0,0004% Na_2WO_4 / Erdextraktasche}	8,9	9,0

[1]) Siehe Abschnitt II.

Tab. 7. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 6.—11. 5. 1936.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
+ 0,00001% Na_2MoO_4	17,1	17,7
– {0,00001% Na_2MoO_4 0,0004% Na_2WO_4}	19,9	20,9
+ 0,001% Na_2MoO_4	31,9	33,8
+ {0,001% Na_2MoO_4 0,0004% Na_2WO_4}	32,7	33,7
– 0,00001% $NaVO_3$	10,0	10,9
+ {0,00001% $NaVO_3$ 0,0004% Na_2WO_4}	14,8	15,2
+ 0,0001% $NaVO_3$	14,9	15,7
– {0,0001% $NaVO_3$ 0,0004% Na_2WO_4}	20,5	19,9

Kombinationen der drei Elemente gemachten Erfahrungen wohl erklärlich, daß die Wirkung des Vanadiums und diejenige des Wolframs durch Erdextraktasche erhöht wird, nicht aber, daß auch die Molybdänwirkung durch die Asche eine Steigerung erfährt. Denn die Förderung der Stickstoffbindung durch optimale Molybdän-Konzentrationen wird durch gleichzeitige Vanadium- und Wolframgaben nicht weiter verstärkt.

Auffallend ist, daß in diesen Versuchen die Stickstoffgewinne in den vanadium- und molybdänhaltigen Lösungen, vor allem in Tab. 5, infolge ungünstiger Beeinflussung durch den We-Faktor ziemlich niedrig liegen, und daß es die Erdextraktasche in keinem Fall vermocht hat, diese Werte über 30 hinaus zu heben. Deshalb ist die Annahme berechtigt, daß die Wirkung dieser Asche nicht auf irgendeinem weiteren in bestimmter Weise katalytisch wirksamen Element neben Molybdän und Vanadium beruht, sondern auf anderen, vielleicht physikalischen Eigenschaften[1]), die wiederum wahrscheinlich zum We-Faktor in Beziehung stehen, so daß dessen ungünstiger Einfluß unter Umständen durch die Asche teilweise wieder aufgehoben werden kann. So wird es verständlich, daß in einem anderen Versuch zur Zeit einer etwas besseren Wirkung des We-Faktors durch Erdasche nur eine ganz geringe Steigerung der Molybdänwirkung erzielt werden konnte.

Tab. 8. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 25. 4.—1. 5.1936.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
+ Erdextraktasche	8,1	8,1
+ 0,001% Na_2MoO_4	22,2	24,6
+ {0,001% Na_2MoO_4 Erdextraktasche}	25,8	25,8

Wegen dieser unspezifischen Wirkungsweise der Erdextraktasche und wegen anderer in Abschnitt III und IV zu erwähnender Beobachtungen ist es höchst unwahrscheinlich, daß die Wirkung des Molybdäns auf die Stickstoffbindung überhaupt wesentlich gesteigert werden kann, eine optimale Beeinflussung durch den We-Faktor allerdings vorausgesetzt. Dafür spricht auch die gewöhnlich gute Übereinstimmung der Analysenwerte von Parallel-

[1]) Rippel (1936).

kulturen mit optimaler Molybdänkonzentration, sofern diese Werte nicht weit unter 30 liegen (We-Faktor!). Deshalb hat auch die Ansicht Schröders (1932), daß zur Erzielung eines kräftigen Azotobakter-Wachstums außer Molybdän noch Wolfram, Kupfer, Zink und Silicium stickstofffreien synthetischen Nährlösungen zugesetzt werden mussen, wenig Wahrscheinlichkeit für sich. Hinsichtlich des Wolframs geht das schon aus obigen Versuchen hervor. Zink und Kupfer haben sich in besonders gereinigten Lösungen für zahlreiche nicht stickstoffbindende niedere und höhere Pflanzen als lebensnotwendig erwiesen (Steinberg 1935, Sommer 1930). Möglicherweise würde sich unter solchen Umständen auch die Notwendigkeit für Azotobakter herausstellen. Dann bestände aber trotzdem zwischen diesen Elementen und der Stickstoffbindung noch kein Zusammenhang, wie er aus den Zahlen Schröders unbedingt gefolgert werden muß. Diese besagen nämlich, daß Wolfram, Silicium und Kupfer ausschließlich für die Stickstoffbindung und nicht für die Aufnahme gebundenen Stickstoffs notwendig sind. Die Verf.n selbst gibt zu, daß an ihren Ergebnissen noch manches unklar sei. Man kann sich des Eindrucks nicht erwehren, daß hier der nicht berücksichtigte We-Faktor zu Trugschlussen Anlaß gegeben hat, es sei denn, daß sich der von Schröder benutzte Azotobakter-Stamm völlig abweichend verhält. In eigenen Versuchen konnten die Angaben Schröders jedenfalls nicht bestätigt werden.

Tab. 9. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 2.—8. 5. 1936.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
+ 0,0005% Na_2MoO_4	28,3	29,7
+ { 0,0005% Na_2MoO_4; 0,0005% $ZnSO_4$; 0,0002% $CuSO_4$; 0,0005% Na_2WO_4; 0,001% Na_2SiO_3 }	27,2	27,2

Zu Beginn des sichtbaren Azotobakter-Wachstums war deutlich zu erkennen, daß sich die Kulturen mit Natriummolybdat als einzigem Zusatz zur Nährlösung etwas besser entwickelten als die nach Schröder behandelten. Mit Mannit, das diese als Kohlenstoffquelle verwendet hat, wurden keine anderen Ergebnisse erzielt.

Das mikroskopische Bild 6 Tage alter Kulturen von A. chroococcum mit und ohne Zusatz von Vanadium und Molybdän sieht nicht nur verschieden aus in bezug auf die Zellenzahl, die den Stickstoffwerten entspricht, sondern auch hinsichtlich der Zellformen. Während in der Grundnährlösung ohne Zusatz und mit Vanadium die Zellen gleichmäßig groß und rund sind, zeigen molybdänhaltige Kulturen zwischen zahlreichen kleineren runden nur vereinzelt große runde und auch schlauchförmige Zellen.

Die Farbstoffbildung, die bei A. vinelandii besonders lebhaft ist und zwischen grünen und roten Tönungen wechselt, ist bei dieser Art insofern abhängig von der Vanadium- und Molybdän-Konzentration, als in Nährlösungen ohne Zusatz dieser beiden Elemente entsprechend der geringen Bakterienentwicklung meistens überhaupt keine Färbung auftritt. Ist jedoch das Wachstum etwas stärker (s. Tab. 11), dann pflegt sich die Nähr-

lösung rot zu färben. Warum sich diese Azotobakter-Art mitunter ohne Vanadium oder Molybdän, wenn auch nicht sehr kräftig, zu entwickeln vermag, konnte noch nicht restlos geklärt werden. Bei Gegenwart von Vanadium wird die Lösung stets grün gefärbt, während in molybdänhaltigen Lösungen, wie früher (1930) bereits mitgeteilt wurde, Rotfärbung eintritt. Jedoch ist diese außer vom Molybdängehalt auch noch abhängig vom Kalkgehalt der Nährlösung. Mit 0,1% Kalziumkarbonat wurden immer grüne bis gelbliche, mit 0,5% rote Färbungen erhalten. Der braunschwarze Farbstoff von A. chroococcum wird in stickstofffreien synthetischen Nährlösungen fast gar nicht gebildet. In Lösungen mit Erdzusatz wird die Ausbildung dieses Farbstoffes durch Zugabe von Molybdän gehemmt.

II. Bestimmung der optimalen Konzentrationsbereiche von Molybdän und Vanadium.

Ein gewisser Überblick über die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Molybdän und Vanadium war schon vor Jahren bei den ersten Versuchen gewonnen worden. Es schien jedoch wünschenswert, die vollständigen Ertragskurven dieser beiden Elemente, und zwar für beide in Versuch genommene Azotobakter-Arten experimentell festzulegen und miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zwecke wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Natriummolybdat und Natriumvanadat in mehreren Versuchen geprüft, die hier aus praktischen Gründen nicht in Kurven, sondern nur tabellarisch soweit zusammengefaßt sind, wie es die verschiedene Beeinflussung durch den Wc-Faktor erlaubt.

Tab. 10. (Zusammengestellt aus 2 Versuchen.)
Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung.

Datum	Nährlösung	mg N in 100 ccm	
26. 11.—2. 12. 1935	Steril	0,3	0,3
26. 11.—2. 12. 1935	Ohne Zusatz	1,2	1,2
26. 11.—2. 12. 1935	+ 0,0000005% Na_2MoO_4	3,2	3,2
18.—24. 12. 1935	+ 0,000001% Na_2MoO_4	5,6	6,4
18.—24. 12. 1935	+ 0,000002% Na_2MoO_4	6,8	7,2
	(Siehe Tab. 11.)		
26. 11.—2. 12. 1935	+ 0,0001% Na_2MoO_4	27,2	24,8
18.—24. 12. 1935	+ 0,001% Na_2MoO_4	22,0	24,8
26. 11.—2. 12. 1935	+ 0,1% Na_2MoO_4	26,8	26,4
18.—24. 12. 1935	+ 0,5% Na_2MoO_4	13,6	13,6
18.—24. 12. 1935	+ 2,5% Na_2MoO_4	0,3	0,3

Tab. 11. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 30. 5.—4. 6. 1936

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Steril	0,5	0,5
Ohne Zusatz	0,9	0,9
+ 0,000003% Na_2MoO_4	6,7	6,9
+ 0,00001% Na_2MoO_4	16,8	17,5
+ 0,00003% Na_2MoO_4	28,9	29,7
+ 0,0001% Na_2MoO_4	32,8	33,8

Tab. 12. (Zusammengestellt aus 2 Versuchen.)
Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung.

Datum	Nährlosung	mg N in 100 ccm	
26. 11.—2. 12. 1935	Steril	0,3	0,3
26. 11.—2. 12. 1935	Ohne Zusatz	1,2	1,2
26. 11.—2. 12. 1935	+ 0,0000001% $NaVO_3$	2,8	4,0
18.—24. 12. 1935	+ 0,0000002% $NaVO_3$	2,0	2,0
18.—24. 12. 1935	+ 0,000001% $NaVO_3$	3,4	4,0
26. 11.—2. 12. 1935	+ 0,000005% $NaVO_3$	18,0	11,2
18.—24. 12. 1935	+ 0,00001% $NaVO_3$	13,2	13,2
26. 11.—2. 12. 1935	+ 0,0001% $NaVO_3$	17,2	14,4
18.—24. 12. 1935	+ 0,0005% $NaVO_3$	15,6	17,2

(Fortsetzung siehe Tab. 13.)

Tab. 13. Azotobacter chroococcum in Glukosenahrlösung. 30. 5.—4. 6. 1936

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Steril	0,5	0,5
Ohne Zusatz	0,9	0,9
+ 0,0001% $NaVO_3$	17,1	19,3
+ 0,001% $NaVO_3$	5,0	6,2
+ 0,003% $NaVO_3$	3,3	3,3
+ 0,01% $NaVO_3$	1,8	2,0
+ 0,03% $NaVO_3$	0,5	0,5

Tab. 14. (Zusammengestellt aus 2 Versuchen.)
Azotobacter vinelandii in Glukosenährlösung.

Datum	Nährlösung	mg N in 100 ccm	
15.—20. 2. 1935	Steril	0,3	0,3
15.—20. 2. 1935	Ohne Zusatz	1,6	1,6
15.—20. 2. 1935	+ 0,0000008% Na_2MoO_4	6,7	7,6
15.—20. 2. 1935	+ 0,000004% Na_2MoO_4	13,7	14,3
15.—20. 2. 1935	+ 0,00002% Na_2MoO_4	15,6	15,6
23.—28. 1. 1935	+ 0,0001% Na_2MoO_4	15,1	15,2
23.—28. 1. 1935	+ 0,0005% Na_2MoO_4	15,0	15,2
23.—28. 1. 1935	+ 0,002% Na_2MoO_4	15,7	16,8
15.—20. 2. 1935	+ 0,01% Na_2MoO_4	11,5	13,3
15.—20. 2. 1935	+ 0,03% Na_2MoO_4	13,6	14,9

(Fortsetzung siehe Tab. 15.)

Tab. 15. Azotobacter vinelandii in Glukosenährlösung. 18.—24. 12. 1935

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Steril	0,3	0,3
Ohne Zusatz	5,7[1]	8,5[1]
+ 0,001% Na_2MoO_4	25,4	26,3
+ 0,1% Na_2MoO_4	23,0	23,8
+ 0,5% Na_2MoO_4	19,4	21,4
+ 2,5% Na_2MoO_4	0,3	0,3

[1]) Solche verhältnismäßig hohen Werte in Nährlösungen ohne Molybdän- oder Vanadiumzusatz wurden niemals bei A. chroococcum, jedoch zuweilen bei A.

Tab. 16. Azotobacter vinelandii in Glukosenährlösung. 20.—25. 5. 1936.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Steril	0,5	0,5
Ohne Zusatz	3,8	4,1
+ 0,000000001% $NaVO_3$	3,4	4,0
+ 0,00000001% $NaVO_3$	7,3	7,2
+ 0,00000003% $NaVO_3$	8,7	9,0
+ 0,0000001% $NaVO_3$	11,2	13,1
+ 0,0000003% $NaVO_3$	16,8	15,6
+ 0,00001% $NaVO_3$	20,5	20,6
+ 0,00003% $NaVO_3$	21,1	19,7
+ 0,0001% $NaVO_3$	18,8	17,4
+ 0,0003% $NaVO_3$[1])	11,0	11,3
+ 0,001% $NaVO_3$	2,1	2,6
+ 0,003% $NaVO_3$	1,6	1,7
+ 0,01% $NaVO_3$	1,6	1,5
+ 0,03% $NaVO_3$	0,5	0,5

[1]) Diese Konzentration, die hinsichtlich der Stickstofffernte schon oberhalb der Optimalkonzentration liegt, hat die weitaus stärkste Grünfärbung der Nährlösungen bewirkt. Jedoch scheint das nicht immer so zu sein.

Aus diesen Zahlen sind die Optimalbereiche der Molybdän- und Vanadium-Konzentrationen unschwer zu errechnen, wenn 1 Na_2MoO_4 = 0,466 Mo und 1 $NaVO_3$ = 0,263 V gesetzt wird. Diese Bereiche sind verhältnismäßig sehr groß, vor allem für Molybdän. Von einer Giftigkeit hoher Molybdän-Konzentrationen kann überhaupt nicht gesprochen werden. Denn die Schädigung durch 2,5% Natriummolybdat wird kaum noch als spezifische Molybdänwirkung angesehen werden können.

Tab. 17.

Optimale Wirkung		
des Molybdäns	des Vanadiums	
auf A. chroococcum und A. vinelandii	auf A. chroococcum	auf A. vinelandii
von ca. 1 : 50 000 000 bis ca. 1 : 1000	von ca. 1 : 100 000 000 bis ca. 1 : 250 000	von ca. 1 : 100 000 000 bis ca. 1 : 4 000 000

Von Burk (1934) und Burk und Horner (1935) wurden an A. vinelandii schon ähnliche Feststellungen gemacht, die aber insofern mit obigen Daten nicht übereinstimmen, als nicht, wie jene Autoren mitteilen, Vanadium sich so verhält wie Molybdän. Vielmehr liegen bei diesem sowohl die untere als auch besonders die obere Grenze des Optimalbereichs höher als beim Vanadium. Während Burk fand, daß 0,02% Vanadium wie Molybdän noch keine Schädigung hervorrufen,

vinelandii beobachtet und zwar immer dann, wenn die Kulturen zur Zeit einer günstigen Beeinflussung durch den We-Faktor gewachsen waren. Es scheint, als ob unter solchen Bedingungen A. vinelandii auch ohne eine besondere Molybdän- oder Vanadiumgabe imstande wäre, geringe, aber immerhin größere Stickstoffmengen zu binden als A. chroococcum. Vielleicht ist es u. a. auch hierdurch erklärlich, daß die Molybdän- und Vanadiumwirkung Burk und Lineweaver (1931) zunächst entgangen ist, die ihre Versuche nur an A. vinelandii ausgeführt haben.

konnte festgestellt werden, daß Vanadium im Gegensatz zu Molybdän für A. chroococcum schon bei 0,008% und für A. vinelandii schon bei 0,0003% hemmend wirkt gegenüber der Vergleichskultur ohne Molybdän- oder Vanadiumzusatz. Vollkommen verhindert wird das Wachstum beider Arten schon durch 0,008% Vanadium. Auch ist die kleinste optimal wirkende Konzentration beider Elemente größer als Burk und Horner angeben (1 : 50 000 000 bzw. 1 : 100 000 000 statt 1 : 10 000 000 000).

III. Über die Wirkung von Molybdän und Vanadium auf den ökonomischen Koeffizienten von Azotobacter chroococcum in stickstofffreier Nährlösung.

Nachdem es feststand, daß Molybdän und Vanadium das Azotobakter-Wachstum in stickstofffreier Nährlösung und damit den Stickstoffgewinn ganz bedeutend zu steigern vermögen, war noch die Frage zu klären, ob diese Elemente nur den gesamten Stoffumsatz beschleunigen, oder ob sie auch den auf die Einheit verbrauchter Kohlenstoffquelle bezogenen Stickstoffgewinn erhöhen. Deshalb wurden von einer gleichzeitig angesetzten größeren Zahl von A. chroococcum-Kulturen zu den in Tab. 18 angegebenen Zeiten fortlaufend jedesmal je zwei Kulturen der drei verschiedenen Nährlösungsreihen zur Bestimmung sowohl des Stickstoffgewinns als auch des Zuckerverbrauchs herangezogen. Zwecks Trennung der Bakterien von der Nährlösung erhielt diese unter Schütteln tropfenweise 0,5—1,5 ccm einer 5 proz. Aluminiumsulfat-Lösung. Je nachdem, ob die Nährlösung weniger oder mehr Bakterien enthielt, wurde auch vom Aluminiumsulfat weniger oder mehr verbraucht, und zwar so viel, bis die Fällung eben vollständig war. Der Aluminium-Bakterien-Niederschlag wurde durch ein quantitatives, gehärtetes Filter vorsichtig abgesaugt und mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Im Rückstand mitsamt dem Filter wurde dann der Stickstoff nach Kjeldahl und im Filtrat der Zucker nach Fehling bestimmt. Auf die Ermittelung des von den Azoto-

Tab. 18. Azotobacter chroococcum in 2,5 proz. Glukosenährlösung. 15 — 20. 2. 1936.

Kulturdauer und Nährlösung	Je 100 ccm verbr. Glukose in g		Je 100 ccm gebundener N in mg		Der auf 1 g Glukose gebundene N in mg	
Nach 2 Tagen:						
Ohne Zusatz	0,4	0,2	0,4	0,4	1,0	2,0
+ 0,00002% $NaVO_3$	0,4	0,2	1,2	0,8	3,0	4,0
+ 0,001% Na_2MoO_4	0,6	0,6	10,0	10,0	16,7	16,7
Nach 3 Tagen:						
Ohne Zusatz	0,5	0,5	0,4	0,4	0,8	0,8
+ 0,00002% $NaVO_3$	1,3	1,3	2,8	2,8	2,2	2,2
+ 0,001% Na_2MoO_4	1,5	1,5	17,6	17,6	11,7	11,7
Nach 4 Tagen:						
Ohne Zusatz	1,4	1,4	0,4	0,8	0,3	0,6
+ 0,00002% $NaVO_3$	1,8	1,7	4,8	4,4	2,7	2,6
+ 0,001% Na_2MoO_4	2,4	2,4	24,4	24,4	10,2	10,2
Nach 5 Tagen:						
Ohne Zusatz	1,4	1,4	0,8	0,8	0,6	0,6
+ 0,00002% $NaVO_3$	2,0	2,0	5,6	5,6	2,8	2,8
+ 0,001% Na_2MoO_4	2,5	2,5	25,2	25,2	10,1	10,1

bakter-Zellen in die Nährlösung abgeschiedenen organisch gebundenen Stickstoffs und Ammoniaks konnte wegen Geringfügigkeit der Mengen verzichtet werden (s. auch Roberg, 1935).

Es hat sich so gezeigt, daß während der ganzen Versuchszeit auf 1 g verbrauchter Glukose in Gegenwart von Molybdän am meisten, mit Vanadium weniger und ohne Zugabe eines der beiden Elemente am wenigsten Stickstoff gebunden wurde. D. h., daß die Energieausbeute mit Molybdän am größten, mit Vanadium geringer und bei Abwesenheit beider Elemente am kleinsten ist. Wird der für die hohen Anfangswerte des ökonomischen Koeffizienten der Molybdänreihe zugrunde gelegte Verbrauch an Glukose umgerechnet in mg Kohlenstoffverbrauch, so ergibt sich ein Verhältnis von gebundenem Stickstoff zu verbrauchtem Kohlenstoff wie 1 : 24. Das ist ein Wert, der sich wahrscheinlich unter dem Einfluß günstigerer Witterung noch etwas erhöhen würde und dem im Boden vorliegenden Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis sehr nahekommt. Selbst die Zugrundelegung des mittleren ökonomischen Koeffizienten der Molybdänreihe von 11,7, der einem Kohlenstoffverbrauch von 600 mg entspricht, führt noch zu einem Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis von 1 : 33. Es kann hier also zum Energiegewinn nur wenig Zucker verbraucht worden sein, weshalb auch aus diesem Grunde mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden muß, daß eine weitere wesentliche Steigerung der Stickstoffbindung in molybdänhaltigen Nährboden bei optimaler Wirkung des We-Faktors nicht möglich ist.

IV. Über die Wirkung von Molybdän, Vanadium und Wolfram auf die Aufnahme gebundenen Stickstoffs durch Azotobakter.

Die Frage, welchen Einfluß die drei Elemente Molybdän, Vanadium und Wolfram auf die Aufnahme gebundenen Stickstoffs durch Azotobakter ausüben, verdiente eine ausführliche Untersuchung, weil sie sowohl für Fragen der landwirtschaftlichen Praxis als auch für die genauere Beurteilung der Wirkung dieser Elemente im Stickstoffbindungsprozeß von wesentlicher Bedeutung ist. Burk und Lineweaver (1931) haben diese Frage zuerst aufgeworfen und dahingehend beantwortet, daß Molybdän auch die Aufnahme von Nitratstickstoff fördert. Daraus müsse unbedingt gefolgert werden, daß Molybdän nicht die eigentliche Bindung des Luftstickstoffs, sondern nur die Aufnahme bereits gebundenen Stickstoffs katalysiert, und daß einzig und allein das schon von Krzemieniewska (1910) als für Azotobakter lebensnotwendig erkannte Kalzium der spezifische Katalysator der Stickstoffbindung sei, das nur durch Strontium vertreten werden könne. Diese Schlußfolgerung ist aber m. E. durchaus keine zwingende Notwendigkeit. Warum soll Molybdän nicht die Aufnahme sowohl des gebundenen als auch des molekularen Stickstoffs fördern können? Außerdem war die Möglichkeit gegeben, daß das durch Molybdän gesteigerte Wachstum in nitrathaltiger Nährlösung lediglich auf einer gesteigerten Stickstoffbindung beruhte, und daß Nitrat verschont blieb, was in weitgehendem Maße, wenn auch nicht vollständig, gerade bei A. vinelandii tatsächlich der Fall ist (Tab. 19 und 21). Von den genannten amerikanischen Autoren wurden entsprechende Analysen nicht mitgeteilt. 1931 haben auch Fuller und Rettger nachweisen können, daß Azotobakter in der verwendeten molybdänfreien Nährlösung, die 0,01% Stickstoff in gebundener Form enthielt, noch Stickstoff aus der Luft binden konnte. Um hier klar zu sehen, hat Birch-Hirschfeld

(1932) die Stickstoffbindung ganz ausgeschaltet dadurch, daß sie in Sauerstoff-Wasserstoff-Atmosphäre kultivierte, die jedoch nicht den natürlichen Verhältnissen entspricht und deshalb keine Schlüsse über das Verhalten von Azotobakter unter natürlichen atmosphärischen Bedingungen zuläßt. Immerhin hat sich so ergeben, daß Molybdän die Aufnahme von Nitratstickstoff in Sauerstoff-Wasserstoff-Atmosphäre nicht fördert. Burk (1934) und Burk und Horner (1935) sind, nachdem sie diese Beobachtung bestätigen konnten, nunmehr auch überzeugt, daß Molybdän und Vanadium eine spezifische Rolle bei der Stickstoffbindung spielen müssen, und meinen, in Bloms (1931) Katalysatorsystem sei das Eisen durch Molybdän zu ersetzen. Da aber Molybdän unter Sauerstoff-Wasserstoff-Atmosphäre auch die Aufnahme organisch gebundenen Stickstoffs und die des Ammoniakstickstoffs fördern soll, so wurde hieraus und aus anderen Beobachtungen von Burk und Horner geschlossen, daß Kalzium die erste Phase der Stickstoffbindung katalysiert und erst dann Molybdän zur Wirkung kommt. Denn Kalzium fördere die Aufnahme gebundenen Stickstoffs nicht oder nur wenig. Das ist eine Anschauung, die bezüglich Nitratstickstoff durch Schröder (1932) bereits eine Bestätigung erfuhr, obwohl die von ihr veröffentlichten Zahlen nicht sehr überzeugend in dieser Hinsicht sind. Sollte das Kalzium hier wirklich eine Sonderstellung einnehmen, dann wäre allerdings die Ansicht berechtigt, daß diesem Element der erste Platz in der Reihe der Katalysatoren der Stickstoffbindung gebührt. Das trifft jedoch keineswegs zu. Denn unter natürlichen atmosphärischen und in jeder Hinsicht optimalen Bedingungen wird die Aufnahme des Nitratstickstoffs wie des elementaren Stickstoffs auch durch Kalzium beschleunigt (Tab. 19 und 20).

Daß Burk und seine Mitarbeiter zu gegenteiligen Ergebnissen gekommen sind, kann auch dadurch begründet sein, daß sie offenbar die Wirkung des Kalziums auf die Aufnahme des Nitratstickstoffs in molybdänfreien Nährlösungen untersucht haben. Dann wird allerdings Kalzium ebensowenig fördernd wirken wie Molybdän, wenn Kalzium fehlt. Aber selbst wenn diese Annahme zutrifft, macht es zunächst immer noch stutzig, weshalb auch Schröder (1932) die Anschauung bestätigen zu müssen glaubte, daß Kalzium die Aufnahme des Nitratstickstoffs nicht fördert. Jedoch läßt sich auch hierfür eine zwanglose Erklärung geben. Schröder hat nämlich Mannit als Kohlenstoffquelle verwendet, das meistens genügend Kalzium als Verunreinigung enthält[1]).

Der wesentlichste Grund aber, weshalb Burk und Lineweaver (1931) zunächst Molybdän als Katalysator der biologischen Stickstoffbindung abgelehnt haben und nur Kalzium bzw. Strontium eine solche Rolle zubilligten, scheint darin zu liegen, daß diese Autoren das Problem der biologischen Stickstoffbindung von einer ganz anderen Fragestellung aus bearbeitet haben. Sie bemühen sich, den enzymatischen Chemismus der Stickstoffbindung zu klären, während es bei den eigenen Untersuchungen darauf ankam, festzustellen, welche Faktoren außer den bereits bekannten, zu denen auch Kalzium gehörte, für eine größtmögliche Stickstoffbindung weiterhin notwendig sind, wobei es ganz gleichgültig war, ob sich solche Faktoren unmittelbar oder mittelbar an diesem Vorgang beteiligen. Nur so konnten einige bodenkundliche Fragen einer befriedigenden Beantwortung

[1]) In den untersuchten Präparaten verschiedenen Reinheitsgrades konnte Ca durch Fällung mit Ammoniumoxalat nachgewiesen werden.

nähergebracht werden. Von demselben praktischen Gesichtspunkt aus wurde auch die Wirkung von Molybdän, Vanadium und Wolfram auf die Aufnahme gebundenen Stickstoffs geprüft und mit der Wirkung des Kalziums verglichen. Diese Versuche, die deshalb unter natürlichen atmosphärischen Bedingungen ausgeführt werden mußten, können aber vielleicht darüber hinaus im Vergleich mit den in Sauerstoff-Wasserstoff-Atmosphäre vorgenommenen Untersuchungen von Burk und Mitarbeitern auch manche Anregung geben für die Beurteilung der Aufgaben, die diese Elemente im Stoffwechsel der Azotobakter-Zelle zu erfüllen haben.

Für die Bestimmung des tatsächlich aus der Nährlösung aufgenommenen Stickstoffs mußte eine Analysenmethode gewählt werden, die eine Trennung dieses Stickstoffs von dem aus der Luft gebundenen ermöglichte. Das Verfahren war mit einigen Abänderungen das gleiche wie das in Abschnitt III beschriebene. Jede Kultur einer größeren Versuchsserie, die nicht an einem Tage analytisch verarbeitet werden konnte, erhielt am Ende der Kultivierungszeit zunächst 1 ccm einer 5°/₀₀igen Sublimatlösung zwecks Abtötung der Bakterien. War in der Nährlösung organisch gebundener Stickstoff enthalten, so wurde das Filtrat nach vorherigem Ansäuern mit Schwefelsäure und Eindampfen ebenso wie das Filter mit der Bakterienfällung nach Kjeldahl analysiert. War dagegen Ammonsalz oder Nitrat gegeben worden, dann wurde der Stickstoffgehalt der Filtrate durch Destillation nach Zusatz von etwas Natronlauge bzw. Magnesiumoxyd, Magnesiumchlorid und Arndtscher Legierung ermittelt. Zur Vermeidung des Überschäumens wurde der durch die Apparatur gedrückte Luftstrom in letzterem Falle verstärkt.

Tab. 19. Azotobacter vinelandii in Glukosenährlösung mit $NaNO_3$ und 0,001% Na_2MoO_4 ohne Ca-Zusatz in 150 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben. 4.—9. 5. 1936.

Nährlösung	mg Nitrat-N in 100 ccm		mg N in Al-Fällung aus 100 ccm		mg Gesamt-N in 100 ccm		mg N-Gewinn oder -Verlust in 100 ccm	
Steril	22,1		0,6		22,7		—	
Ohne Zusatz	19,2	18,7	1,9	2,2	21,1	20,9	— 1,6	— 1,8
+ 0,1% $CaCO_3$	10,2	8,9	25,1	26,1	35,3	35,0	+12,6	+12,3

Tab. 20. Azotobactor chroococcum in Glukosenährlösung mit $NaNO_3$ und 0,001% Na_2MoO_4 ohne Ca-Zusatz. 13.—18. 5. 1936.

Nährlösung	mg Nitrat-N in 100 ccm		mg N in Al-Fällung aus 100 ccm		mg Gesamt-N in 100 ccm		mg N-Gewinn oder -Verlust in 100 ccm	
Steril	23,0		0,6		23,6		—	
Ohne Zusatz	1,5	7,5	20,6	14,7	22,1	22,2	—1,5	—1,4
+ 0,1% $CaCO_3$	0,0	0,0	26,9	29,8	26,9	29,8	+3,3	+6,2

Aus diesen Analysen geht zunächst hervor, daß unter optimalen Bedingungen A. vinelandii offenbar weniger leicht Nitratstickstoff aufnimmt als A. chroococcum, dabei aber intensiv Stickstoff bindet. Es kommt infolgedessen zu einer stärkeren Anreicherung des Nährbodens mit Stickstoff. Der Beweis für dieses unterschiedliche Verhalten wird mit dem folgenden unmittelbaren Vergleich dieser beiden Arten erbracht.

Tab. 21. Glukosenährlösung mit $NaNO_3$ und 0,001% Na_2MoO_4. 29. 5.—2. 6. 1936.

Nährlösung	mg Nitrat-N in 100 ccm		mg N in Al-Fällung aus 100 ccm		mg Gesamt-N in 100 ccm		mg N-Gewinn in 100 ccm	
Steril	15,7		0,6		16,3		—	
Mit A. chroococcum	0,0	0,0	33,0	34,1	33,0	34,1	+16,7	+17,8
Mit A. vinelandii	3,6	4,2	35,8	35,2	39,4	39,4	+23,1	+23,1

A. vinelandii bevorzugt also bei Gegenwart von Nitrat den atmosphärischen Stickstoff und ist unter diesen Umständen ein stärkerer Stickstoffbinder als A. chroococcum (s. auch Fußnote zu Tab. 15).

Die Zahlen der Tab. 19 und 20 können ferner den Anschein erwecken, als sei Kalzium der Aufnahme des Nitratstickstoffs zwar dienlich, aber nicht in dem Maße wie der Aufnahme des elementaren Stickstoffs. Denn in Abwesenheit gebundenen Stickstoffs wächst Azotobakter ohne Kalziumgabe überhaupt nicht oder äußerst kümmerlich. Wird dagegen eine nitrathaltige Nährlösung besonders kräftig mit A. chroococcum beimpft, dann wird ohne Kalziumzusatz fast ebensoviel Nitratstickstoff aufgenommen, wie wenn die Lösung Kalzium enthielte. Das Wachstum ist proportional der verimpften Bakterienmenge. Auch Burk (1934) hat schon darauf hingewiesen, daß die Kalziumwirkung in stickstofffreier Nährlösung besonders deutlich wird, wenn zur Impfung eine an Kalzium verarmte Kultur Verwendung findet. Die bei den in Tab. 19 und 20 mitgeteilten Versuchen zur Impfung benutzten Kulturen waren aber nicht an Kalzium verarmt. Deshalb sind die Unterschiede zwischen — Ca und + Ca nicht größer ausgefallen. Immerhin muß aus dem Verhalten von Azotobakter in Nährlösungen ohne Kalziumzusatz geschlossen werden, daß zur Aufnahme elementaren Stickstoffs mehr Kalzium notwendig ist als zur Aufnahme von Nitratstickstoff, wodurch diesbezügliche Feststellungen Burks (1934) und Horners und Burks (1934) bestätigt werden. Ähnliches gilt aber auch für Molybdän, wie das aus den Tab. 11 und 23 hervorgeht. Während nach Burk (1934) unter künstlicher Sauerstoff-Wasserstoff-Atmosphäre nur zuweilen eine Förderung der Aufnahme von Nitratstickstoff durch Molybdän in verhältnismäßig hohen Konzentrationen (0,0005%—0,005% Na_2MoO_4) beobachtet werden konnte, zeigen die eigenen Versuche, daß unter natürlicher Atmosphäre zur maximal beschleunigten Aufnahme des Nitratstickstoffs weniger Molybdän erforderlich ist als zur maximal beschleunigten Bindung des elementaren Stickstoffs (0,000001% bzw. 0,0001% Na_2MoO_4). Ein Beweis für die Anschauung, daß die Rolle des Kalziums als Katalysator der Stickstoffbindung spezifischer sei als die des Molybdäns, konnte somit unter diesen natürlicheren Versuchsbedingungen nicht erbracht werden.

Übrigens ist Kalzium ein Element, das in verhältnismäßig großen Konzentrationen für viele höhere und niedere Pflanzen, die keinen Stickstoff binden, unentbehrlich ist, während Molybdän offenbar nur bei stickstoffbindenden Organismen eine lebenswichtige Funktion in dem bei Azotobakter nachgewiesenen Umfange zu erfüllen hat (Ter Meulen, 1931 und 1932). Kalzium soll außerdem für den stickstoffbindenden Bacillus amylobacter nach Beijerinck (1922) nicht notwendig sein, was allerdings genauer nachgeprüft werden müßte.

Inwieweit Molybdän unter natürlichen atmosphärischen Bedingungen die Aufnahme des Nitratstickstoffs tatsächlich fördert, dürfte aus den Tab. 22 und 23 mit genügender Klarheit hervorgehen. Man wird zugeben müssen, daß die Wirkung ganz erheblich ist, wenn man nicht die sehr unwahrscheinliche Annahme machen will, daß der Nitratstickstoff infolge Denitrifikation in die Luft entwichen ist und Azotobakter nur aus der Luft Stickstoff aufgenommen hat. Stapp und Ruschmann (1924) haben früher schon gefunden, daß der Stickstoff von 0,1% Kaliumnitrat, allerdings bei Zimmertemperatur, von A. chroococcum in der verwendeten molybdänfreien Nährlösung erst nach 75—91 Tagen verbraucht worden war. Mit Molybdän ist dagegen eine solche Lösung schon nach 5 Tagen nitratfrei.

Tab. 22. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung.

Datum	Nährlösung	mg Nitrat-N in 100 ccm		mg N in Al-Fällung aus 100 ccm		mg Gesamt-N in 100 ccm		mg N-Gewinn oder -Verlust in 100 ccm	
6.–12. 3. 1936	Ohne Nitrat								
	Steril	—		—		0,6		—	
	Ohne Zusatz . . .	—		—		0,8	0,9	0,8	0,9
	$+0{,}0005\%Na_2WO_4$	—		—		0,9	1,0	0,9	1,0
	$+0{,}00002\%NaVO_3$	—		—		6,7	7,1	6,7	7,1
	$+0{,}001\% Na_2MoO_4$	—		—		28,9	27,7	28,9	27,7
6.–12. 3. 1936	Mit Nitrat:								
	Steril	14,1		0,6		14,7		—	
	Ohne Zusatz . . .	11,8	11,9	2,8	2,8	14,6	14,7	—0,1	± 0,0
	$+0{,}0005\%Na_2WO_4$	0,0	4,8	14,1	10,1	14,1	14,9	—0,6	+ 0,2
	$+0{,}00002\%NaVO_3$	12,8	13,1	13,7	12,1	26,5	25,2	+11,8	+10,5
	$+0{,}001\% Na_2MoO_4$	0,0	0,0	27,9	30,6	27,9	30,6	+13,2	+15,9
27. 9.– 3. 10. 1935	Mit Nitrat:								
	Steril	19,9		0,6		20,5		—	
	Ohne Zusatz . . .	11,8	13,7	5,5	3,0	17,3	16,7	—3,2	—3,8
	$+0{,}0005\%Na_2WO_4$	0,0	0,0	16,8	16,2	16,8	16,2	—3,7	—4,3
	$+0{,}00002\%NaVO_3$	14,3	14,3	15,2	15,1	29,5	29,4	+9,0	+8,9
	$+0{,}001\% Na_2MoO_4$	0,0	0,0	27,4	27,1	27,4	27,1	+6,9	+6,6
6.–12. 3. 1936	Mit Nitrat:								
	Steril	44,1		0,6		44,7		—	
	Ohne Zusatz . . .	41,6	42,8	4,1	3,9	45,7	46,7	+1,0	+2,0
	$+0{,}0005\%Na_2WO_4$	25,0	34,9	19,3	9,5	44,3	44,4	—0,4	—0,3
	$+0{,}00002\%NaVO_3$	41,7	40,5	8,6	10,0	50,3	50,5	+5,6	+5,8
	$+0{,}001\% Na_2MoO_4$	13,3	12,1	25,9	26,1	39,2	38,2	—5,5	—6,5

Tab. 23. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung.
23.—28. 5. 1936.

Nährlösung	mg Nitrat-N in 100 ccm		mg N in Al-Fällung aus 100 ccm		mg Gesamt-N in 100 ccm		mg N-Gewinn oder -Verlust in 100 ccm	
Steril	20,3		0,6		20,9		—	
Ohne Zusatz	17,7	18,0	3,0	3,0	20,7	21,0	— 0,2	+ 0,1
$+ 0{,}000001\% Na_2MoO_4$	0,0	0,0	20,2	20,2	20,2	20,2	— 0,7	— 0,7
$+ 0{,}00001\% Na_2MoO_4$	0,0	0,0	27,0	26,3	27,0	26,3	+ 6,1	+ 5,4
$+ 0{,}001\% Na_2MoO_4$. .	0,0	0,0	28,0	28,3	28,0	28,3	+ 7,1	+ 7,4

Die untere Grenze der optimalen Molybdänkonzentrationen für die Stickstoffaufnahme aus Nitrat liegt auffallend niedrig, niedriger als für die

Stickstoffbindung, worauf oben beim Vergleich mit der Kalziumwirkung schon hingewiesen wurde. Es ist deshalb möglich, daß mit Rücksicht auf das im Impfgut und in der Nährlösung enthaltene Molybdän und Kalzium diese Elemente auch für die Aufnahme des Nitratstickstoffs unentbehrlich sind.

Weitere Versuche haben ergeben, daß die Assimilation des Nitratstickstoffs mit 0,0000001% Natriummolybdat gegenüber derjenigen mit 0,000001% schon erheblich verlangsamt, gegenüber derjenigen ohne Molybdän aber noch stark beschleunigt ist.

Die Reduktion des Nitrats und die Aufnahme seines Stickstoffs durch Azotobakter werden aber nicht nur vom Molybdän, sondern fast in gleichem Maße auch vom Wolfram gefördert, dessen Einfluß schon in einer Konzentration von 0,000001% sichtbar ist. Hier zeigt sich die biochemische Verwandtschaft beider Elemente deutlicher als bei der Aufnahme des elementaren Stickstoffs, wobei Wolfram eine fördernde Wirkung höchstens andeutungsweise erkennen läßt. Die Beschleunigung der Nitratreduktion durch Molybdän und Wolfram ist so stark, daß sie zu deutlichen Stickstoffverlusten führen kann, in Gegenwart von Molybdän infolge gleichzeitiger starker Förderung der Stickstoffbindung allerdings nur bei Verabreichung besonders großer Nitratmengen. Ob es im einzelnen Falle zu einem Stickstoffverlust kommt, der auch in Lösungen ohne Molybdän, Vanadium oder Wolfram eintreten kann, worauf schon Blom (1931) und Birch-Hirschfeld (1932) hingewiesen haben, wird von irgendwelchen unbekannten Faktoren abhängen, vielleicht auch vom We-Faktor. Vanadium hat dagegen nie zu Stickstoffverlusten, sondern immer zu deutlichen Stickstoffgewinnen geführt, sogar in der Nährlösung, die 0,044% Nitratstickstoff enthielt. Durch Vanadium wird also die Aufnahme von Nitratstickstoff nicht, wohl aber die Stickstoffbindung trotz Anwesenheit von Nitrat gefördert. Demnach verhält es sich nicht nur anders als Wolfram, das lediglich die Aufnahme des Nitratstickstoffs fördert, sondern in dieser Hinsicht auch anders als Molybdän, durch das sowohl die Assimilation des elementaren als auch die des Nitratstickstoffs beschleunigt wird. Vanadium und Wolfram bilden so gewissermaßen zwei Extreme, zwischen denen Molybdän eine Mittelstellung einnimmt.

Auf Grund der obigen Ergebnisse und aus theoretischen Erwägungen heraus kann die Assimilation des Nitratstickstoffs nicht mehr Kalorien erfordern als die des elementaren Stickstoffs der Luft. Dann muß aber aus den Zahlen der Tab. 22 weiterhin gefolgert werden, daß A. chroococcum mit Molybdän die größtmögliche Menge Stickstoff bindet, und daß diese Fähigkeit nicht weiter gesteigert werden kann. Denn bei Gegenwart von Nitrat wird nicht mehr Stickstoff in Bakterieneiweiß festgelegt als bei Abwesenheit gebundenen Stickstoffs. Voraussetzung für diese Schlußfolgerung ist natürlich wieder, daß auch der We-Faktor eine günstige Wirkung ausübt.

Gegenüber Ammoniumsulfat (Tab. 24) verhält sich Azotobakter anders als gegenüber Nitrat insofern, als bekanntlich der Ammonstickstoff schon ohne Zusatz von Molybdän, Vanadium oder Wolfram bedeutend schneller aufgenommen wird. Trotzdem wird auch die Assimilation des Ammonstickstoffes noch gefördert durch Molybdän und Wolfram, während sie ebenso wie die Aufnahme des Nitratstickstoffes durch Vanadium keine Beschleunigung erfährt. Ein wesentlicher Unterschied zu den nitrathaltigen Kulturen

besteht ferner darin, daß in den ammonhaltigen Vanadium im Gegensatz zum Molybdän Azotobakter offenbar nicht zur Stickstoffbindung anzuregen vermag.

Tab. 24. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 18.—24. 6. 1936.

Nährlösung	mg Ammon-N in 100 ccm		mg N in Al-Fällung aus 100 ccm		mg Gesamt-N in 100 ccm		mg N-Gewinn oder -Verlust in 100 ccm	
Ohne Ammoniumsulfat:								
Steril	—		—		0,3		—	
Ohne Zusatz	—		—		1,0	1,0	+ 0,7	+ 0,7
+ 0,0004% Na_2WO_4	—		—		1,1	1,3	+ 0,8	+ 1,0
+ 0,00002% $NaVO_3$	—		—		15,4	13,4	+ 15,1	+ 13,1
+ 0,001% Na_2MoO_4	—		—		29,7	28,5	+ 29,4	+ 28,2
Mit Ammoniumsulfat[1]):								
Steril a[2])	20,5		—		—		—	
Steril b[2])	18,7[3])		1,0		19,7		—	
Ohne Zusatz	6,9	6,8	10,0	9,0	16,9	15,8	— 2,8	— 3,9
+ 0,0004% Na_2WO_4	3,1	4,1	15,4	14,3	18,5	18,4	— 1,2	— 1,3
+ 0,00002% $NaVO_3$	5,9	7,9	12,8	11,0	18,7	18,9	— 1,0	— 0,8
+ 0,001% Na_2MoO_4	0,4	0,5	26,5	26,2	26,9	26,7	+ 7,2	+ 7,0

[1]) In etwa 2 proz. wässeriger Lösung, getrennt von der Nährlösung sterilisiert und dieser dann steril zugefügt (1 ccm zu 25 ccm Nährlösung).

[2]) a = zu Beginn, b = am Ende des Versuchs, um zu zeigen, daß während der Versuchszeit NH_3 aus den Kolben in die Luft entwichen ist.

[3]) Bei der Berechnung der nachfolgenden Analysenwerte in Tab. 24 ist diese Zahl und nicht die darüber stehende zugrunde gelegt worden.

Tab. 25. Azotobacter chroococcum in Glukosenährlösung. 29. 4.—5. 5. 1936.

Nährlösung	mg Asparagin-N in 100 ccm		mg N in Al-Fällung aus 100 ccm		mg Gesamt-N in 100 ccm		mg N-Gewinn oder -Verlust in 100 ccm	
Ohne Asparagin:								
Steril	—		—		1,1		—	
Ohne Zusatz	—		—		1,5	1,3	+ 0,4	+ 0,2
+ 0,0004% Na_2WO_4	—		—		1,8	1,7	+ 0,7	+ 0,6
+ 0,00002% $NaVO_3$	—		—		12,3	14,0	+ 11,2	+ 12,9
+ 0,001% Na_2MoO_4	—		—		30,9	30,9	+ 29,8	+ 29,8
Mit Asparagin:								
Steril	23,3		1,0		24,3		—	
Ohne Zusatz	19,8	20,5	4,3	3,8	24,1	24,3	— 0,2	± 0,0
+ 0,0004% Na_2WO_4	19,2	17,0	5,7	7,8	24,9	24,8	+ 0,6	+ 0,5
+ 0,00002% $NaVO_3$	13,9	13,1	28,2	29,6	42,1	42,7	+ 17,8	+ 18,4
+ 0,001% Na_2MoO_4	15,7	15,4	36,8	37,0	52,5	52,4	+ 28,2	+ 28,1

Wieder anders ist die Wirkung der Elemente Molybdän, Vanadium und Wolfram bei der Aufnahme des Stickstoffs aus der organischen Verbindung Asparagin (Tab. 25). Molybdän, das die Aufnahme des elementaren wie des Nitrat- und Ammonstickstoffs am stärksten fördert, wirkt hier schwächer als Vanadium. Wolfram und Vanadium verhalten sich vergleichsweise ähnlich wie bei der Aufnahme elementaren Stickstoffs und umgekehrt wie bei der Aufnahme des Nitratstickstoffs. In keinem

Falle aber wird der Asparaginstickstoff so schnell assimiliert wie der Nitrat- und Ammonstickstoff bei Gegenwart von Molybdän oder Wolfram. Nitrat und Ammonsulfat sind also jedenfalls für A. chroococcum, wenn ihm optimale Lebensbedingungen geboten werden, keine schlechteren Stickstoffquellen als Asparagin, sondern sehr wahrscheinlich bessere. Dasselbe gilt bestimmt für den elementaren Stickstoff der Luft, der bei Gegenwart von Asparagin viel intensiver aufgenommen wird als der allgemein als leicht assimilierbar geltende Stickstoff dieser organischen Verbindung, sofern Molybdän oder Vanadium gleichzeitig zur Verfügung stehen. Infolgedessen kommt es auch zu verhältnismäßig sehr großen Stickstoffanreicherungen in den Asparagin-Nährlösungen mit Molybdän oder Vanadium. Andererseits müßte aber aus den auffallend hohen Werten für den in den Bakterien festgelegten Stickstoff der Aluminium-Fällung der molybdän- und vanadiumhaltigen Nährlösungen geschlossen werden, daß hier eigenartigerweise der Energieverbrauch geringer ist als in den entsprechenden Lösungen mit Nitrat oder ohne gebundenen Stickstoff und deshalb mehr Glukose zum Aufbau von Zelleiweiß verwendet werden konnte. Das ist jedoch kaum denkbar. Vielmehr scheinen diese Zahlen zu besagen, daß Asparagin nicht nur als Stickstoffquelle, sondern auch als zusätzliche Kohlenstoffquelle gedient hat.

Obwohl Versuche über die Wirkung verschiedener Kombinationen von Molybdän, Vanadium und Wolfram auf die Aufnahme gebundenen Stickstoffs noch ausstehen, können doch aus den vorliegenden Ergebnissen mit einiger Wahrscheinlichkeit schon gewisse weitere Schlüsse gezogen werden. Für optimale Versuchsbedingungen hat die Feststellung Burks und Lineweavers (1930), daß schon Mengen gebundenen Stickstoffs oberhalb 0,0005% jede Stickstoffbindung sistieren, keine Gültigkeit. Selbst der von Hanzawa (1914) angegebene Schwellenwert von 2,5 Teilen Stickstoff auf 100 Teile Kohlenstoff braucht nach den vorliegenden Versuchsergebnissen die Stickstoffbindung noch nicht zu verhindern. Bei Gegenwart von Vanadium wurde sogar noch Stickstoff gebunden, obwohl in der Nährlösung schon ein Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis von rund 5 : 100 vorlag (44,1 mg Nitrat-N in 100 ccm), und in der asparaginhaltigen Nährlösung wurde mit Vanadium und Molybdän noch sehr intensiv Stickstoff gebunden bei einem anfänglich vorliegenden Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis von rund 2,8 : 100.

Die Möglichkeiten der Stickstoffanreicherung ärmerer Böden sind also größer als bisher vielfach angenommen wurde. Denn organisch gebundener Stickstoff, wie er etwa im Asparagin vorliegt, ist für viele heterotrophe Bodenmikroorganismen gut verwertbar, weniger gut aber für Azotobakter. Nitrat- und Ammonstickstoff schließlich werden zwar von Azotobakter in Reinkulturen leicht aufgenommen, jedoch wird dieser Spezialist unter den Mikroben im Boden kaum die Möglichkeit dazu haben, weil ihm in den Algen, anderen Mikroorganismen und den höheren Pflanzen schärfste Konkurrenten gegenüberstehen und nur selten größere Nitratmengen zugleich mit genügend organisch gebundenem Kohlenstoff vorkommen werden. Ihm ist der unerschöpfliche Stickstoffvorrat der Luft zur Verfügung gestellt, von dem er reichlich assimilieren wird trotz eines gewissen Bodenvorrats an gebundenem Stickstoff, wenn nur eine ausreichende Kohlenstoffquelle, genügende Mengen Nährsalze einschließlich derjenigen des Molybdäns und Vanadiums und sonstige günstige Lebensbedingungen gegeben sind.

V. Über die Wirkung von Molybdän und Vanadium auf das Wachstum von Bacillus amylobacter und Knöllchenbakterien in stickstofffreier Nährlösung.

Da Molybdän und in geringerem Umfange Vanadium Wachstum und Stickstoffbindung von Azotobakter in stickstofffreien Nährlösungen so ausschlaggebend fördern, war anzunehmen, daß sie auf andere frei im Boden lebende Stickstoffbinder in ähnlicher Weise wirken würden, ganz besonders auf das Bakterium, das hinsichtlich seiner stickstoffbindenden Fähigkeit unmittelbar nach Azotobakter einzuordnen ist, nämlich Bac. amylobacter. Ein gewisser, wenn auch noch nicht sehr deutlicher Hinweis auf ein solches Verhalten dieses Bakteriums lag in dem Ergebnis eines Rohkulturversuchs, bei dem als Impfgut eine Erdaufschwemmung mit Zusätzen von A. chroococcum, A. vinelandii und Bac. amylobacter verwendet worden war.

Tab. 26. Glukosenährlösung mit 0,5% $CaCO_3$. 12.—16. 7. 1935.

Nährlösung	mg N in 100 ccm
Steril	1,1
Ohne Zusatz	7,3 13,4 15,1 keine Gasbildung
+ 0,0005% Na_2MoO_4	30,2 30,8 31,9 starke Gasbildung

Obwohl die Stickstoffwerte für die Kontrollkulturen ohne Molybdän infolge der fördernden Wirkung des zur Impfung verwendeten Erdauszuges schon ziemlich hoch liegen, wurde mit Molybdän doch noch eine Erhöhung des Stickstoffgewinns erzielt. Vor allem waren Gasbildung und starke Entwicklung von Bac. amylobacter nur in den drei molybdänhaltigen Kulturen zu erkennen. Das mag in erster Linie durch die stärkere Azotobakter-Entwicklung bedingt gewesen sein. Möglich war es aber auch, daß Bac. amylobacter durch Molybdän unmittelbar gefördert worden war.

Der Beweis für die Annahme, daß Molybdän und Vanadium auch die Stickstoffbindung dieses Bakteriums fördern, wurde dann mit Reinkulturen, bzw. Mischkulturen, bestehend aus Bac. amylobacter und A. chroococcum, erbracht.

Daß auch solche Mischkulturen verwendet wurden, ergibt sich aus dem Umstand, daß Bac. amylobacter im hiesigen Laboratorium in Mischung mit A. chroococcum in Kultur gehalten wird. Es hatte sich nämlich herausgestellt, daß sich der Bacillus auf diese einfache Weise in Glukosenährlösung mit Molybdän und einem Überschuß von Kalziumkarbonat sehr lange im Reagensröhrchen lebensfähig erhalten läßt. In diesen Kulturen sorgt Azotobakter für den schnellen Verbrauch des schädlichen Sauerstoffs. Soll nun Bac. amylobacter allein in Versuch genommen werden, dann braucht man eine solche Kultur nur etwa 10 Min. lang auf 60—70° C zu erhitzen, so daß nur die Sporen des Bacillus am Leben bleiben.

Vor Versuchsbeginn wurden die Kulturen erst 1—2 mal in Nährlösung ohne Molybdän übergeimpft. Die Erlenmeyer-Kolben mit den beimpften Nährlösungen standen während der Versuchsdauer im Exsikkator über einer Lösung von

20 g Pyrogallol und 15 g wasserfreiem Natriumkarbonat in 200 ccm Wasser bei einer Temperatur von 29° C.

Tab. 27. Sporen von Bacillus amylobacter in 50 ccm Glukosenährlösung mit 1% $CaCO_3$ in 150 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben. 8.—24. 2. 1936.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Ohne Zusatz	1,0	1,2
+ 0,00001% $NaVO_3$	2,2	2,2
+ 0,001% Na_2MoO_4	2,6	2,6

Nach 4—5 Tagen hatte sich in den Kulturen mit Molybdän oder Vanadium deutlich, in den Kontrollkulturen dagegen nur sehr schwach Gas gebildet.

Tab. 28[1]). Mischkultur von Bacillus amylobacter mit Azotobacter chroococcum in 25 ccm Glukosenährlösung mit 0,4% $CaCO_3$ in 100 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben. Als Blindversuch 2 Kolben mit Mo und Azotobakter allein. 10.—19. 3. 1936.

Nährlösung	mg N in 100 ccm	
Im Blindversuch.	0,6	
Ohne Zusatz	1,1	1,5
+ 0,00001% $NaVO_3$	5,3	5,3
+ 0,001% Na_2MoO_4	6,6	7,8

[1]) Der Unterschied zwischen den N-Werten dieser Tabelle und den entsprechenden in Tab. 27 kann auch durch den We-Faktor bedingt sein.

Nach 5 Tagen war in den Kulturen ohne Zusatz noch keine, in denen mit Molybdän oder Vanadium starke Gasbildung zu beobachten. Erst nach 9 Tagen bildete sich auch etwas Gas in den Nährlösungen ohne Zusatz. Nach Zugabe von Schwefelsäure war nur in den Gefäßen mit molybdän- oder vanadiumhaltigen Nährlösungen deutlicher Buttersäuregeruch wahrnehmbar. Mikroskopisch ließ sich ebenfalls nur in diesen Kulturen Bac. amylobacter in großer Zahl und mit reichlichem Iogengehalt nachweisen, während in den Lösungen ohne Zusatz kaum eine typische Zelle von Bac. amylobacter gesehen wurde.

Die in der Literatur oft erwähnte Beobachtung, daß Bac. amylobacter seine stickstoffbindende Fähigkeit auf künstlichen Substraten allmählich einbüßt, und daß diese Eigenschaft durch Erdpassage oder Zusatz von Erdextrakten, Humaten und ähnlichen Stoffen regeneriert werden kann, dürfte zum Teil auch auf ein Molybdän- oder Vanadiumbedürfnis dieses Bakteriums zurückzuführen sein. Die günstige Wirkung von Erde usw. wird nicht nur auf der kolloidalen Beschaffenheit solcher Zusätze beruhen, wie u. a. Lantzsch (1921) angenommen hat, sondern auch auf ihrem möglichen Molybdän- oder Vanadiumgehalt.

Eine Wirkung von Molybdän und Vanadium auf Knöllchenbakterien von Pisum sativum in stickstofffreier Nährlösung konnte nicht festgestellt werden, obwohl Leguminosen nach Ter Meulen (1931) auffallend viel Molybdän enthalten und auch auf eine Molybdändüngung reagieren, worüber an anderer Stelle berichtet werden wird. Die Bakterien

haben sich in stickstofffreier Nährlösung weder mit noch ohne Molybdän, Vanadium oder Wolfram sichtbar vermehrt.

VI. Über die Wirkung von Molybdän, Vanadium und Wolfram auf nicht stickstoffbindende Mikroorganismen.

Ebenso wie Molybdän und Vanadium auf Reinkulturen von Knöllchenbakterien waren diese Elemente sowie Wolfram in Konzentrationen, die für Azotobakter optimal sind, augenscheinlich wirkungslos auf Aspergillus niger in gewöhnlichen ammon- und nitrathaltigen Nährlösungen, die nicht durch besondere Maßnahmen von ihrem mutmaßlichen Gehalt an solchen Spurenelementen befreit worden waren. Das muß hervorgehoben werden, weil Steinberg (1936) entdeckt hat, daß sich in gereinigter Nährlösung die Lebensnotwendigkeit des Molybdäns auch für Aspergillus niger nachweisen läßt. Steinberg meint, daß darum dieses Schwermetall nicht als ein Katalysator der Stickstoffbindung angesehen werden könne. Dem gegenüber muß jedoch betont werden, daß sich bis jetzt die stickstoffbindenden Organismen als die molybdänbedürftigsten erwiesen haben. Zwischen diesem Element und der Stickstoffbindung muß also irgendein Zusammenhang bestehen, auch wenn darüber hinaus Molybdän allgemein im Stickstoff-Stoffwechsel lebensnotwendig sein sollte.

Cellvibrio- und Cytophaga-Arten wurden in ebenfalls ungereinigten Nährlösungen durch Molybdän und Vanadium weder gehemmt noch gefördert, durch Wolfram aber deutlich gehemmt. Keines der drei Elemente hatte einen sichtbaren Einfluß auf das denitrifizierende Bact. pyocyaneum in gewöhnlicher nitrathaltiger Nährlösung.

In Anbetracht dieser vielen negativen Ergebnisse war es um so überraschender, daß angereicherte Rohkulturen von Nitrit- und Nitratbildnern, wenn auch nicht sehr stark und nicht immer sehr deutlich, durch Molybdän in ihrer nitrifizierenden Tätigkeit gefördert wurden, während Vanadium teils etwas fördernd, teils etwas hemmend und Wolfram immer hemmend wirkte.

Zur Anwendung kam folgende Nährlösung: H_2O 100; $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 bzw. $NaNO_2$ 0,1; K_2HPO_4 0,1; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,05; $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ Spur; $CaCO_3$ im Überschuß. Kultiviert wurde bei 26° C.

In einem Versuch vom 8.—26. 11. 1935 in 300 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben mit je 25 ccm Nährlösung, der teilweise 0,0001% Na_2MoO_4 oder 0,0001% Na_2WO_4 oder 0,00001% $NaVO_3$ zugesetzt worden waren, ergab sich am Ende folgendes Bild bei der Prüfung auf Nitrit mit Griesschem Reagens: In sämtlichen Nitritbildnerkulturen war der Nitritgehalt nur gering, aber immerhin in denen mit Molybdän oder Vanadium etwa doppelt so groß wie in denen mit Wolfram oder ohne Zusatz. Die Nitratbildnerkulturen zeigten die günstige Wirkung des Molybdäns noch deutlicher, während hier Vanadium hemmend gewirkt hatte. Es färbten sich die molybdänhaltigen Lösungen schwach rosa, diejenigen ohne Zusatz intensiv rot, die vanadiumhaltigen noch stärker und die wolframhaltigen bei weitem am stärksten.

In einem anderen Versuch mit Nitratbildnern, ausgeführt vom 3. 3.—1. 4. 1936, war die Reaktion auf Nitrit in den Kulturen mit 0,001% Na_2MoO_4 nach 25 Tagen, in denen ohne Zusatz erst nach 29 Tagen negativ.

Es ist deshalb durchaus richtig, wenn S. und H. Winogradsky (1933) ihrem für nitrifizierende Bakterien synthetisierten Kieselgelnähr-

boden mit doppelt destilliertem Wasser außer Spuren von Zink, Titan und Aluminium auch solche von Molybdän zufügten.

Einen Anspruch auf Vollkommenheit erheben die vorstehenden Versuche über Nitrifikation nicht. Sie sollen nur ein Hinweis sein auf die merkwürdige Erscheinung, daß unter den nicht stickstoffbindenden Organismen gerade diese kohlenstoff-autotrophen Spezialisten durch besondere Molybdängaben, wie es scheint, in ihren Lebensäußerungen gefördert werden und darum vielleicht größerer Molybdänmengen bedürfen als andere, heterotrophe Mikroorganismen, wenn auch kleinerer Mengen als die Stickstoffbinder.

Abschließend sei Herrn Oberregierungsrat Dr. Stapp für die Unterstützung, die er mir bei Ausführung vorstehender Untersuchungen stets zukommen ließ, mein aufrichtiger Dank ausgesprochen.

Zusammenfassung.

In Kulturversuchen mit Nährlösungen verschiedener Zusammensetzungen unter natürlichen atmosphärischen Bedingungen wurde folgendes festgestellt:

1. Molybdän und Vanadium fördern die Stickstoffbindung durch A. chroococcum, A. vinelandii und Bac. amylobacter, Molybdän teilweise bis fast zum 100fachen des Wertes, der ohne Anwesenheit dieser Elemente durch Azotobakter erreicht wird. Daraus wird geschlossen, daß ohne Molybdän oder Vanadium keine nennenswerte Stickstoffbindung möglich ist.

2. Der Optimalbereich erstreckt sich für Molybdän von etwa 1 : 50 000 000 bis etwa 1 : 1000, für Vanadium von etwa 1 : 100 000 000 bis etwa 1 : 250 000 (A. chroococcum) bzw. 1 : 4 000 000 (A. vinelandii).

3. Wolfram erhöht die fördernde Wirkung optimaler und unteroptimaler Vanadiumkonzentrationen und unteroptimaler Molybdänkonzentrationen.

4. Erdextraktasche kann unter Umständen neben Molybdän eine zusätzliche fördernde Wirkung entfalten, die aber offenbar nicht spezifisch ist.

5. Molybdän und Vanadium bewirken auch eine Erhöhung der auf die Einheit verbrauchten Kohlenstoffs gebundenen Stickstoffmenge.

6. Trotz Anwesenheit gebundenen Stickstoffs vermögen A. chroococcum und A. vinelandii noch sehr gut Stickstoff zu binden, wenn Molybdän und teilweise auch wenn Vanadium zugegen ist.

7. Bei Gegenwart von Molybdän kann die Stickstoffbindung sehr wahrscheinlich nicht weiter gesteigert werden, weil, abgesehen von anderen Gründen, unter gleichen Versuchsbedingungen auch bei Gegenwart von Nitrat oder Ammonsalz nicht mehr Stickstoff aufgenommen wird.

8. Die Aufnahme von Nitratstickstoff wird durch Molybdän und Wolfram gefördert, durch Vanadium nicht. Dabei ist Wolfram maximal wirksam schon bei höchstens 1 : 200 000 000.

9. Kalzium fördert ebenfalls nicht nur die Aufnahme atmosphärischen Stickstoffs, sondern auch diejenige des Nitratstickstoffs. Molybdän wie Kalzium entfalten hierbei ihre maximale Wirkung schon in geringeren Konzentrationen als bei der Stickstoffbindung.

10. Die Assimilation des Ammonstickstoffs wird ebenfalls durch Molybdän, weniger durch Wolfram und gar nicht durch Vanadium gefördert.

11. Die Aufnahme von Asparaginstickstoff wird durch Molybdän und Vanadium, sehr wenig auch durch Wolfram gefördert.

12. Unter optimalen Versuchsbedingungen sind Luftstickstoff, Ammonsalz und Nitrat für A. chroococcum leichter verwertbare Stickstoffquellen als Asparagin, und für A. vinelandii ist der atmosphärische Stickstoff noch leichter assimilierbar als Nitratstickstoff.

13. Von den geprüften nicht stickstoffbindenden Mikroorganismen werden in gewöhnlichen ungereinigten Nährlösungen nur nitrifizierende Bakterien in ihrer Tätigkeit durch Molybdänzusatz schwach gefördert.

Literatur.

Beijerinck, W. W., Azotobacter chroococcum als Indikator der Fruchtbarkeit des Bodens. (Koninkl. Acad. van Wetensch. Amsterdam, Wisk en Natk. Afd. 30. 1922. S. 431.) — Birch-Hirschfeld, L., Über den Einfluß von Molybdän und Bodenextraktstoffen auf die N-Bindung von Azotobacter chroococcum. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 3. 1932. S. 341—361.) — Blom, J., Ein Versuch, die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des molekularen Stickstoffs durch Mikroorganismen zu erklären. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 60—86.) — Bortels, H., Biokatalyse und Reaktionsempfindlichkeit bei niederen und höheren Pflanzen. (Angew. Bot. Bd. 11. 1929. S. 285—332.) — Ders., Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 333—342.) — Ders., Kurze Notiz über die Katalyse der biologischen Stickstoffbindung. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 87. 1933. S. 476—477.) — Ders., Organische Dünger auch durch mineralische Bestandteile bedeutungsvoll. (Mitt. f. d. Landw. Bd. 49. 1934. S. 341—342.) — Burk, D., Azotase und Nitrogenase in Azotobakter. (Ergebn. d. Enzymforsch. Bd. 3. 1934. S. 23—56.) — Burk, D. und Horner, C. K., The specific catalytic rôle of molybdenum and vanadium in nitrogen fixation and amide utilization by Azotobacter. (Transact. of the III. Intern. Congr. of Soil Science, Oxford. Vol. 1. 1935. p. 152—155.) — Burk, D. und Lineweaver, H., The influence of calcium and strontium upon the catalysis of nitrogen fixation by Azotobacter. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 2. 1931. S. 155—186.) — Dies., The influence of fixed nitrogen on Azotobacter. (Journ. of Bact. Vol. 19. 1930. p. 389—414.) — Burk, D., Lineweaver, H. und Horner, C. K., Iron in relation to the stimulation of growth by humic acid. (Soil Science. Vol. 33. 1932. p. 413—453.) — Dianowa, E. W. und Woroschilowa, A. A., Azotobakterähnliche Bakterien im Boden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 433—452.) — Fuller, J. E. und Rettger, L. F., The influence of combined nitrogen on growth and nitrogen fixation by Azotobacter. (Soil Science. Vol. 31. 1931. p. 219—234.) — Hanzawa, J., Einige Beobachtungen über Stickstoffbindung durch Azotobakter in stickstoffarmen und stickstoffreichen Substraten. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 41. 1914. S. 573—576.) — Heinze, B., Weitere Untersuchungen über die sog. Azotobakterorganismen als „frei" im Boden lebende Stickstoffsammler. (Landw. Jahrb. Bd. 64. 1926. S. 127—147.) — Horner, C. K. und Burk, D., Magnesium, calcium, and iron requirements for growth of Azotobacter in free and fixed introgen. (Journ. of Agric. Res. Vol. 48. 1934. p. 981—995.) — Israilsky, W., Vergleichende Untersuchungen über die Rasseneigentümlichkeiten des B. tumefaciens und verwandter Mikroorganismen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 79. 1929. S. 354—370.) — Iwasaki, K., Weitere Untersuchungen zur Fixation des Luftstickstoffs durch Azotobakter. (Biochem. Ztschr. Bd. 226. 1930. S. 32—46.) — Kluyver, A. J. und van Reenen, W. J., Über Azotobacter agilis Beijerinck. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 4. 1933. S. 280—300.) — Konishi, K. und Tsugo, T., Über die Begünstigung des Azotobakterwachstums durch mineralische Stoffe aus Bodenextrakten. (Bull. of the Agric. Chemic. Soc. of Japan. Vol. 9. 1933. p. 129—144.) [Jap. m. dtsch. Zusfassg.] — Dies., Über die Begünstigung des Azotobakterwachstums durch mineralische Stoffe aus Bodenextrakten. (Fortsetzung.) (Bull. of the Agricult. Chemic. Soc. of Japan. Vol. 10. 1934. p. 584—599.) [Jap. m. dtsch. Zusfassg.] — Krzemieniewska, H., Der Einfluß der Mineralbestandteile der Nährlösung auf die Entwicklung des Azotobakters. (Anz. Akad. Wiss. Krakau, Reihe B. 1910. S. 376. Ref.: Bot. Zentralbl. Bd. 116. 1911. S. 52—53.) — Krzemieniewski, S., Untersuchungen über Azotobacter chroococcum. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 161—173.) — Lantzsch, K., Bacillus amylobacter A. M. et Bred. und seine Beziehung zu den Kolloiden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 54. 1921. S. 1—12.) — Michaelis, L. (Leitfaden f. biochem. Mikro-

meth. Berlin, Selbstverlag d. Vereinigt. Fabr. f. Laboratoriumsbedarf, 1926). — Rippel, A., unter Mitw. von Lehmann, Br., Über die Wirkung von geringen Mengen Agar auf Wachstum und Stickstoffbindung von Azotobakter und auf andere mikrobiologische Vorgänge. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 7. 1936. S. 210—234.) — Roberg, M., Beiträge zur Biologie von Azotobakter. II. Der Stickstoffgehalt der Filtrate von Azotobakterkulturen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 82. 1935. S. 65—98.) — Schröder, M., Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 85. 1932. S. 177—212.) — Sommer, A. L., Mangan, Bor, Zink und Kupfer. (Amer. Fertilizer. Vol. 72. 1930. p. 15—18. Ref.: Chem. Zentralbl. Bd. 101. 1930. II. S. 1384.) — Stapp, C. und Bortels, H., Azotobakterwachstum und Stickstoffbindung in Abhängigkeit vom Wetter. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 94. 1936. S. 497—499.) — Stapp, C. und Ruschmann, G., Zur Biologie von Azotobakter. (Arb. aus d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstw. Bd. 13. 1924. S. 305—368.) — Steinberg, R. A., Nutrient-solution purification for removal of heavy metals in deficiency investigations with Aspergillus niger. (Journ. of Agric. Res. Vol. 51. 1935. p. 413—424.) — Ders., Relation of accessory growth substances to heavy metals, including molybdenum, in the nutrition of Aspergillus niger. (Journ. of Agric. Res. Vol. 52. 1936. p. 439—448.) — Ter Meulen, H., Sur la répartion du molybdène dans la nature. (Rec. d. Trav. Chim. d. Pays-Bas. T. 50. 1931. p. 491—504.) — Ders., Sur l'accumulation du molybdène chez quelques plantes aquatiques. (Rec. d. Trav. Chim. d. Pays-Bas. T. 51. 1932. p. 549—550.) — Ders., Distribution of molybdenum. (Nature. Vol. 130. 1932. p. 966.) — Wieninger, F. M., (Brauerei-Wochenschr. Bd. 50. 1933. Nr. 16.) — Winogradsky, S., Etudes sur la microbiologie du sol. II. Sur les microbes fixateurs d'azote. (Ann. Inst. Pasteur. T. 40. 1926. p. 455—521.) — Winogradsky, S. und Winogradsky, H., Etudes sur la microbiologie du sol. VII. Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification. (Ann. Inst. Pasteur. T. 50. 1933. p. 350—432.)

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über Bacterium herbicola[1].

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel.]

Von **Elisabeth Mack.**

Mit 2 Tafeln.

Einleitung.

Die Kenntnis des Bact. herbicola, eines der häufigsten Epiphyten der höheren grünen Pflanzen, ist noch sehr unvollkommen. Wie die Durchsicht der diesbezüglichen Literaturangaben zeigt, hat es eine zusammenhängende, alle Gesichtspunkte berücksichtigende Bearbeitung noch nicht gefunden.

Eine Reihe von Fragen, vor allem bezüglich seiner physiologischen Eigenschaften und seiner verwandtschaftlichen Beziehungen bedürfen noch der Beantwortung. Unklar ist weiterhin, ob unter dem Begriff „herbicola“ eine Sammelgruppe, die eine Anzahl verschiedener Arten umfaßt, zu verstehen ist, oder ob diese Bezeichnung einem Organismus zukommt, der sich durch eine Reihe von konstanten Eigenschaften scharf von anderen Bakterien unterscheidet. In der bakteriologischen Literatur werden ferner manche gelbwachsende Bakterienstämme in mehr oder weniger ausführ-

[1]) Erschienen als Dissertation der Philosophischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

lichen Darstellungen behandelt, bezüglich der sich die Notwendigkeit einer Abgrenzung, bzw. die Feststellung einer Identität mit Bact. herbicola ergibt.

Auf Grund seines regelmäßigen Vorkommens an gesunden, grünen Pflanzen erhielt das Bact. herbicola von den beiden Schweizer Autoren Burri und Düggeli, die als erste einige genauere, vor allem biologische Angaben bringen, den Namen, der es als einen Pflanzenbewohner charakterisieren soll.

Als Leitbakterium der Weide- und Futterpflanzen hat es gleichfalls einiges Interesse für die Milchwirtschaft. Es erscheint also eine Untersuchung darüber erwünscht, ob Milch und Milchprodukte in ungünstigem Sinne durch diese Keimart verändert werden können, und ob dieselbe imstande ist, sich im Wettbewerb mit der normalen Milchflora zu entwickeln.

Schließlich soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Biologie des Bact. herbicola als eines an das Leben auf der Pflanze angepaßten Organismus liefern und der Klärung der Frage dienen, ob irgendwelche Beziehungen zwischen ihm und der übrigen epiphytischen Pflanzenflora bestehen.

I. Übersicht über die Fundorte des Bact. herbicola.

1. Als wichtigster und ständiger Wohnort des Bact. herbicola haben die grüne Pflanze und ihre Teile zu gelten: an Blättern, Früchten und Samen verschiedener grüner Gewächse konnte der Organismus zu jeder Jahreszeit mit großer Regelmäßigkeit nachgewiesen werden.

2. Totes Pflanzenmaterial, wie Heu, Stroh und Schrot beherbergt ebenfalls den Keim in oft auffallender Menge, was sich aus häufigeren Probenahmen von derartigem Material ergab.

3. Staubarten bestimmter Herkunft sind als Träger und Überträger des Keimes anzusehen, vor allem solche, die sich von getrocknetem Pflanzenmaterial herleiten. Eine größere Zahl von Staubanalysen aus dem Kuhstall der Forschungsanstalt zeigte neben vielen anderen stets das reichliche Vorkommen der charakteristischen, gelbschleimigen Kolonien des Bact. herbicola auf der Agarplatte. In Staubproben aus den Räumen der Lehrmeierei dagegen wurde das Bact. herbicola niemals aufgefunden und im Zimmerstaub nur sehr selten.

4. Die Luft beherbergt den Keim im allgemeinen nicht. Es gelangte Zimmer- und Außenluft neben derjenigen im Kuhstall und im Hof der Forschungsanstalt durch Aufstellen von Luftplatten zur Untersuchung. Häufiger kamen die Kolonien des Bact. herbicola nur da zum Vorschein, wo die Anwesenheit von Pflanzensubstanz Gelegenheit zur Verbreitung gab, nämlich im Kuhstall und seiner näheren Umgebung, wie auch in der Nähe grasbewachsender Flächen.

5. In Proben roher Lieferanten-Milch aus der Lehrmeierei konnte das Bact. herbicola gar nicht selten angetroffen werden. In der Milch eines bestimmten Lieferanten kam es längere Zeit hindurch regelmäßig vor.

6. Einmal nur konnte ein Stamm aus dem Wasser eines Parkteiches isoliert werden; das Hineinfallen von Pflanzenteilen dürfte seine Anwesenheit hier erklärlich machen.

Das Vorkommen des Bact. herbicola auf den lebenden, grünen Pflanzen bedürfte noch einer näheren Untersuchung. Um festzustellen, ob vielleicht nur bestimmte Pflanzen oder Pflanzengruppen als Besiedlungsort in Frage kommen, oder ob die Verbreitung eine allgemeine ist, wurden zur Bearbeitung Blätter, Früchte und Samen verschiedener wilder und kultivierter Gewächse herangezogen.

1. Gruppe: Acker- und Wiesenkräuter.

An Blatteilen von verschiedenen Wiesengräsern, verschiedenen Trifolium-Arten, Taraxacum (Löwenzahn), Rumex acetosa (Sauerampfer), Car-

duus (Distel), Capsella bursa pastoris (Hirtentäschel), Urtica (Brennnessel), Equisetum palustre (Sumpfschachtelhalm), Scirpus (Simse): vorhanden.

2. Gruppe: Kulturgewächse.

An Blatt, Halm und Samen von Secale cereale (Roggen), Triticum vulgare (Weizen), Avena sativa (Hafer), Hordeum vulgare (Gerste), Blatt von Beta vulgaris (Zuckerrübe), Brassica acephala (Grunkohl), Daucus carota (Möhre), Lactuca sativa (Kopfsalat), Samen von Cannabis sativa (Hanf): vorhanden.

3. Gruppe: Sträucher.

An Blatt und Frucht von Crataegus (Weißdorn), Sambucus niger (Holunder), Ribes rubrum (Johannisbeere), Frucht von Evonymus europaeus (Pfaffenhütchen), Prunus spinosa (Schlehe), Rosa dumetorum (Heckenrose): vorhanden. An Frucht von Rubus fruticosus (Brombeere), Rubus Idaeus (Himbeere): nicht vorhanden.

4. Gruppe: Bäume.

An Blatteilen von Fagus silvatica (Buche), Juglans regia (Walnuß), Quercus (Eiche), Aesculus hippocastanum (Roßkastanie): vorhanden. An Blatt und Rinde von Betula verrucosa und Rinde von Quercus: nicht vorhanden.

5. Gruppe: Tropische Gewächse
(aus dem Gewächshaus des Kieler Botanischen Gartens).

An Blatteilen von Chamaerops humilis (Palmae), Dioon edule (Cycadeae), Anthurium andraeanum (Araceae), Aglaonema simplex (Araceae), Sanseviera zeylanica (Liliaceae), Phyllanthus angustifolius (Euphorbiaceae), Cryptanthus bivittatus (Bromeliaceae), Bilbergia speciosa (Bromeliaceae), Ficus edulis (Moraceae), Amomum cardamomum (Zingiberaceae), Eranthemum nigrum (Acanthaceae), Coffea arabica (Rubiaceae), Piper celtidifolium (Piperaceae), Platycerium Hillii (Polypodiaceae), Maranta musaica (Marantaceae): nicht vorhanden.

Wie aus dieser Übersicht hervorgeht, war der Befund überall positiv bei den kleinwüchsigen, krautigen Pflanzen, wobei Art und Standort derselben ohne Belang ist. Die Anwesenheit des Bact. herbicola ist hier ohne weiteres verständlich, da die Ausbreitung über eine beschränkte Fläche bei genügender Feuchtigkeit keine Schwierigkeiten bereitet.

Weniger regelmäßig war das Vorkommen auf Bäumen und Sträuchern; es ist hier jedoch zu beachten, daß ein negativer Befund an der zufällig untersuchten Probe noch nicht bedeutet, daß an dem ganzen Baum sich keine Herbicola-Keime befänden; ebenso kann auch ein positiver Ausfall der Untersuchung rein zufällig zustande gekommen sein, indem durch Staubinfektion (in der Nähe einer Wiese oder eines Kornfeldes) eine sekundäre Besiedlung erfolgt sein kann.

Nach Beijerinck (2) soll die eigentliche saprophytische Flora der Baumblätter der Hauptsache nach aus ganz anderen Mikroben bestehen (Dematium, Blastomyceten, Erdhefen, Schimmelpilzen; Bakterien dagegen nur selten in beträchtlicher Menge).

An den Blattproben der tropischen Gewächse in der feuchtwarmen Luft des Treibhauses ließ sich eine Anwesenheit des Bact. herbicola nicht feststellen. Als Ursache seines Fehlens wäre das Vorherrschen anderer Mikrobenarten infolge der höheren Temperaturen denkbar. Die größte Zahl der beobachteten Kolonien gehörte der Gruppe der Sporenbildner an.

Zur Vervollständigung dieser Übersicht seien noch einige Angaben verschiedener Autoren über das Vorkommen des Bact. herbicola angeführt. Nach diesen wurde der Organismus gefunden:

An den Wurzeln der Gerstenpflanze von Zikes (38), an den Schüppchen des Gerstenkorns von Chrzaszcz (5), am Grünmalz von Morgenthaler (26), auf gesundem Getreide vorherrschend von Wöller (35), an gesunden Samen und Keimpflanzen dominierend von Düggeli (6), auf grünen Pflanzen und pflanzlichen Produkten von Burri (4), an Kleie von Wigger (33), an Stroh und Schwarzstreu, im Mühlenstaub von Kürsteiner (21), an Rotklee, im Kalyptraschleim von Wurzelspitzen von Beijerinck (2), an Kohlblättern von Keipper (19), in der Luft von Molkerei und Kuhstall, immer auf grünen Pflanzen von Hüttig (14, 1).

Eine Abhängigkeit des Vorkommens von irgendwelchen Witterungseinflüssen konnte während einer einjährigen Beobachtungsdauer nicht ermittelt werden. Sowohl nach starkem Regen als auch nach längeren Trockenperioden und Zeiten starker Sonnenstrahlung war das Bakterium stets auf der Oberfläche grüner Pflanzen nachzuweisen, auch in der kalten Jahreszeit verschwand es nicht.

Von Grapengeter (10) wird berichtet, daß heftige Regengüsse die auf pflanzlichem Substrat befindlichen vegetativen Keime stark reduzieren können. Die Gesamtheit der Witterungseinflüsse besteht indessen aus einer so großen Zahl von Faktoren, daß es schwierig sein dürfte, die fördernde oder hemmende Wirkung eines einzelnen zu bestimmen. Es scheint jedenfalls den Beobachtungen zufolge das Bact. herbicola gegen alle Art von Witterungseinflüssen recht widerstandsfähig zu sein.

II. Methoden der Anreicherung und Reinkultur.

Das Bact. herbicola wächst schnell und üppig auf sämtlichen, gebräuchlichen Nährböden. Die Unterscheidung seiner Kolonien von denen anderer Mikroorganismen fällt im allgemeinen nicht schwer: sie erscheinen groß und schleimig-glänzend und sind gekennzeichnet durch einen leuchtend gelben Farbstoff. Auf zuckerhaltigen Nährböden, besonders aber auf Würzeagar, ist die Schleimbildung sehr ausgeprägt, so daß, abgesehen von der Farbe, eine große Ähnlichkeit mit den Kolonien des Bact. aerogenes besteht.

Das auffällige Wachstum auf Würzenährböden konnte mit gutem Erfolg zur Anreicherung aus pflanzlichem und anderem Material benutzt werden; gleichzeitig wurden durch die saure Reaktion dieses Substrates eine ganze Reihe von Begleitorganismen ausgeschaltet, bzw. in ihrer Entwicklung gehemmt.

Die zu untersuchenden Proben gelangten zunächst in Röhrchen mit steriler Würze; nach 1—2 tägigem Wachstum bei Zimmertemperatur oder 30° verriet sich die Anwesenheit des Bact. herbicola mit ziemlicher Sicherheit schon durch die starke, gleichmäßige Trübung und die etwas dickliche Beschaffenheit der Würze. Der Ausstrich einer Öse dieser Kultur auf Würzeagar unter Anwendung von drei Verdünnungen lieferte am nächsten Tage die charakteristischen, gelblich-schleimigen Kolonien dieses Organismus (Abb. 17), häufig schon ohne Beimischung anderer Keime.

Als sicherstes Kennzeichen für das Vorliegen von Herbicola-Kolonien können die typischen „wurstförmigen" Zooglöen gelten (Abb. 9, 12), die sich auf jedem Substrat bilden und schon mit schwacher Vergrößerung wahrzunehmen sind. Auch weißwachsende Rassen des Bact. herbicola, die häufig auf Bouillonagar in recht uncharakteristischen Kolonien erscheinen, sind an diesem Merkmal ohne weiteres zu erkennen; zuweilen kommt jedoch die typische Ausprägung erst nach mehreren Übertragungen zustande.

Bei der Herstellung von Reinkulturen stellte es sich nun aber heraus, daß für eine solche das übliche Ausstrichverfahren ungeeignet war, denn die Kolonien haben die Neigung, ineinander zu fließen und beherbergen zuweilen in ihrem Schleim fremde Keime, die beim Überimpfen immer wieder mit übertragen werden.

Deshalb wurden, ausgehend von einer 24 stünd., zuckerfreien Bouillonkultur, in der die Schleimbildung am wenigsten ausgeprägt ist, verschiedene Verdünnungen hergestellt und diese kräftig geschüttelt, um die durch Schleim verklumpten Zellen möglichst zu trennen. Von der Verdünnung mit der günstigsten Keimzahl, die bis 100 Kolonien pro Platte ergab, wurden Gußplatten mit Gelatine hergestellt, auf denen sich alle Fremdkeime sofort von den charakteristisch strukturierten, gelben Kolonien des Bact. herbicola unterscheiden ließen. Auf diese Weise konnten hartnäckige Begleiter, wie Bact. fluorescens, Bact. aerogenes und Sporenbildner beseitigt werden.

Die so isolierten Stämme wurden als Reinkulturen betrachtet.

III. Allgemeine Charakteristik.

Zur Feststellung der Eigenschaften des Bact. herbicola dienten 28 Stämme verschiedener Herkunft, darunter 26 gelbwachsende, ein farblos wachsender und ein Stamm mit rosa-violetter Farbstoffbildung. Schließlich kam noch ein aus der Sammlung des Kieler Instituts erhaltener, gelbwachsender, als Bact. herbicola A bezeichneter Stamm zur Untersuchung, der von Hüttig isoliert worden ist und hier zum Vergleich mit herangezogen werden soll.

1. Morphologische und kulturelle Eigenschaften.

a) Einzelzelle.

Das Bact. herbicola ist ein Kurzstäbchen von 2—3 μ Länge und 0,7 μ Breite (Abb. 1). Nach der Teilung bleiben die Zellen noch eine Zeitlang im Zusammenhang, so daß man häufig Doppelstäbchen beobachten kann. Der Inhalt der Zelle erscheint hell und homogen; irgendwelche Inhaltskörper oder Reservestoffe sind nicht nachweisbar. Die Färbung nach Gram fällt negativ aus.

Die Stäbchen sind beweglich und tragen meist 2 polare Geißeln (Abb. 7). Demnach würde also das Bact. herbicola zur Pseudomonasgruppe zu stellen sein.

Ein abweichendes Bild bezüglich der Zellform bietet der von Hüttig isolierte, als Bact. herbicola A bezeichnete Stamm. Die Zellen sind nahezu kokkenförmig und messen 1,5—2 μ. Sie bewegen sich meist zu zweien purzelnd durch das Gesichtsfeld (Abb. 4). Sie sind ebenfalls polar begeißelt, doch erwecken die hier erhaltenen Bilder mehr den Anschein von nur einer Geißel. Von Hüttig (14, 1) selbst wird eine peritriche Begeißelung angegeben; die abweichende Form ist nach ihm als eine andere Wuchsform aufzufassen, deren er 8—9 verschiedene im Laufe seiner noch zu erörternden Umwandlungsversuche erhalten haben will. Allerdings konnte festgestellt werden, daß dieser Stamm in Traubenzuckerbouillon schon nach 1—2 Übertragungen eine deutliche Längsstreckung seiner Zellen aufweist; gleichzeitig geht die Beweglichkeit verloren. Diese Erscheinungen dürften jedoch auf die Wirkung der aus dem Traubenzucker gebildeten Säure zurückzuführen sein, da sie sehr schlecht vertragen wird und eine Verminderung der Teilungsintensität zu bewirken scheint. Auf Agar ohne Traubenzucker zurückversetzt, erscheinen wieder die rundlichen, beweglichen Formen.

Diese vermeintliche Kokkenform des Bact. herbicola wurde von Hüttig nach persönlichen Mitteilungen im Frühjahr häufig auf der Rampe der Molkerei auf Luftplatten gefunden. Eigenen Bemühungen ist es jedoch niemals gelungen, eine derartige Form aus der Luft oder von Pflanzenmaterial einzufangen. Wie im Lauf dieser Untersuchung noch gezeigt werden soll, unterscheidet sich dieser Stamm auch in bezug auf andere Eigenschaften wesentlich von den eigenen Stämmen, so daß die Annahme berechtigt erscheint, daß es sich hier um einen ganz anderen Organismus handelt.

Unter bestimmten Bedingungen weisen die Bakterien bemerkenswerte Abweichungen von ihrer normalen Zellform auf. Am sichersten und ausgeprägtesten wurden solche hypertrophischen Zellen durch Zusatz von verschiedenen Kochsalzkonzentrationen zu schwach alkalischem Nähragar erhalten.

An mehreren daraufhin untersuchten Stämmen ließen sich folgende, regelmäßig wiederkehrende Erscheinungen beobachten: bei einem Zusatz von 3% Kochsalz macht sich bereits eine geringfügige Hemmung des Wachstums bemerkbar; bei 5% wird diese erheblich deutlicher; bei 7% erscheinen erst nach längerer Zeit kleinbleibende Kolonien von zähschleimiger Beschaffenheit; bei 10% schließlich bleibt ein Wachstum völlig aus. Der Einfluß des Kochsalzes auf die Zellform ist bei 5% schon sehr ausgeprägt: es treten mehr oder weniger lange und aufgetriebene „Schlauchformen" auf (Abb. 2). Die Anzahl der normalgebliebenen Zellen ist sehr gering. Bei 7% erscheinen dieselben Formen, jedoch sind sie vielfach gekrümmt (Abb. 3). Kokken- und Streptokokkenformen kamen in keinem Falle zur Entwicklung. Die Abänderung der Zellform unter der Einwirkung von Kochsalz erfolgt beim Bact. herbicola also sehr einheitlich in einer Richtung. Unter bestimmten anderen Bedingungen konnte das Auftreten derselben Involutionsformen festgestellt werden, nämlich in sehr alten Milchkulturen und in gehopfter Würze.

In auffälliger Weise unterscheidet sich jedoch wieder das Bact. herbicola A Hüttig von den eigenen Stämmen, indem nämlich bei Kochsalzzusatz gänzlich andere, und zwar zwei verschiedenartige Formen auftreten: ein Teil der Zellen erscheint in Form von Kokken, die entweder wie Streptokokken kettenförmig angeordnet sind oder wie Mikrokokken sich in Tetradenlagerung befinden (Abb. 5). Die Kokkenketten sind in jungen Federstrichkulturen z. T. sehr gut beweglich, einzelne Glieder sind größer und von unregelmäßiger Gestalt. Daneben, häufig in demselben Präparat und bei Anwendung der gleichen Konzentration, kommen auffallend große, einzeln liegende, runde „Blähformen" vor; maximal wurden bei diesen Formen bis zu 4,5 μ im Durchmesser festgestellt (Abb. 6). Das Vorherrschen einer bestimmten Form bei einer bestimmten Konzentration war nicht nachzuweisen.

Die Beobachtungen bezüglich der Streptokokken- und Tetradenformen decken sich völlig mit denen, die von Henneberg (12) an Bact. herbicola im Rahmen einer Arbeit über den Einfluß von Kochsalz auf die Zellform der Bakterien angestellt wurden. Danach ist als sicher anzunehmen, daß nur ein Hüttigscher Stamm zur Untersuchung vorgelegen haben kann. Irgendwelche Faden- oder Schlauchformen kamen indessen bei diesem Stamm bei den eigenen Untersuchungen niemals vor.

Es scheint also die Art und Weise, in der sich die Zellform unter dem Einfluß von Kochsalz verändert, auch in diesem Fall ganz eindeutig festgelegt zu sein. Bezüglich der Form der hypertrophischen Zellen unterscheidet sich also der Hüttigsche Stamm ebenfalls von den eigenen Herbicola-Stämmen.

b) Zellverbände und Koloniebildung.

Das auffallendste Merkmal des Bact. herbicola ist die Bildung von eigenartigen Schleimverbänden auf allen gebräuchlichen Nährböden, in besonderem Maße aber auf solchen, die gut angreifbare Kohlehydrate enthalten. Eine genauere Beschreibung dieser Bildungen gibt bereits Düggeli:

„Die Kolonien des Bact. herbicola zeichnen sich durch Bildung von typischen, auf einen Verschleimungsprozeß zurückzuführende Zooglöen aus, die sich als meist wurstförmige Bakterienkonglomerate erweisen; der Schleim schmilzt im

Wasser ab und läßt die beweglichen Stäbchen frei. Diese Zooglöen erweisen sich als konstantes, erbliches Merkmal von Bact. herbicola aureum."

Die Entstehung der Zooglöen ist gut im Federstrich zu beobachten: es lagern sich erst wenige Zellen reihenförmig zusammen und erst allmählich entsteht durch immer weitere Anlagerung von unbeweglich werdenden Bakterien die charakteristische Wurstform des Verbandes (Abb. 9).

Auf zuckerhaltigen Nährböden und auf Gelatine ist schleimiges Wachstum zu beobachten. Die Zooglöen sind als kompakte Massen schon mit schwacher Vergrößerung innerhalb der Kolonien wahrzunehmen. Milchzuckerhaltige Nährböden, so auch Endoagar, zeigen bei einzelnen Stämmen ebenfalls Schleimbildung und zwar dann, wenn der betreffende Stamm den Milchzucker zu säuern imstande ist.

Auf Bouillonagar ohne Zucker dagegen erscheinen die Kolonien glatt, homogen und feuchtglänzend (Abb. 15). Die Art des Wachstums läßt sich am besten nach der von Henneberg angegebenen Methode der Agardeckglaskultur beobachten (Abb. 8). Die Bakterien vermögen auch unter gänzlich anaeroben Bedingungen zu gedeihen und wachsen dann in Form einer dünnen, trockenen Auflage. Dichtbewachsene Plattenkulturen des Bact. herbicola zeichnen sich durch einen auffallenden, süßlichen Geruch aus. Ablagerungen von kristallinischen Stoffwechselprodukten sind häufig. Auf sterilisierten Kartoffelscheiben wird eine goldgelbe, schleimige Auflage gebildet.

Flüssige Nährböden werden durch die Entwicklung des Bact. herbicola stark getrübt, bei Zuckergehalt kommt Hautbildung zustande. Besonders üppig ist das Wachstum in Bierwürze: sie wird stark schleimig und die Zellen neigen zur Bildung von kettenförmigen Verbänden (Abb. 13). Die Zooglöen zeigen bei Züchtung in Würze einen besonders auffallenden Schleimabstand (Abb. 10).

Der p_H-Bereich, innerhalb dessen der Organismus zu gedeihen vermag, wurde ermittelt durch Benutzung von Traubenzuckerbouillonkulturen, die durch tropfenweises Hinzufügen von Milchsäure und Kalilauge auf abgestufte p_H-Werte gebracht worden waren. Es ergab sich, daß die Wachstumsgrenze im sauren Bereich zwischen 5 und 4,6 p_H liegt und im alkalischen bei 10 p_H. Bis 5,2 p_H ist das Wachstum noch als sehr gut zu bezeichnen.

Abweichend verhält sich in allem wieder das Bact. herbicola A Hüttig. Es bildet unter keinen Umständen Zooglöen, es zeigt auch niemals schleimiges Wachstum. Im Gegensatz zu den eigenen Stämmen ist der Hüttigsche Stamm gegen Säure außerordentlich empfindlich, er wächst daher weder in Würze noch auf Würzeagar.

c) Wachstum und Schleimbildung in synthetischen Nährlösungen.

Die Verwertbarkeit von verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen und deren Einfluß auf die Bildung der Schleimsubstanz läßt sich am besten in Nährlösungen von bekannter chemischer Zusammensetzung beurteilen. Die Stärke der Trübung und der Hautbildung wurde als Maß für die Assimilierbarkeit der zu prüfenden Verbindung genommen. Mikroskopisch wurde gleichzeitig das Ausmaß der Zooglöenbildung festgestellt.

Für alle Versuche wurde die Mineralsalznährlösung von A. Meyer benutzt, angegeben bei Janke-Zikes (17).

In der Versuchsreihe A wurden je 0,5% der Stickstoffverbindungen Kaliumnitrat, Ammoniumnitrat, Ammoniumphosphat, Asparagin, Glykokoll, Pepton (Witte), sowie 1% Traubenzucker als Kohlenstoffquelle zugesetzt.

In der Versuchsreihe B sodann je 1,5% der Kohlehydrate Traubenzucker, Malzzucker, Rohrzucker, Milchzucker, Glycerin, Stärke, Na-lactat, Nazitrat, sowie 1% Pepton als Stickstoffquelle.

Reihe A über die Stickstoffernährung ergab, daß Pepton als beste Stickstoffquelle zu gelten hat. Es kann aber auch als Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden, denn in Peptonnährlösung ohne weiteren Kohlehydratzusatz wird gutes Wachstum mit Bildung von Zooglöen erreicht. Ein sehr gutes Wachstum gewährt ferner Ammoniumphosphat: Haut- und Zooglöenbildung kommt schnell und reichlich zustande. Langsamer, aber auch unter Produktion von Schleimsubstanz, ist die Entwicklung mit den Aminosäuren Asparagin und Glykokoll. Die Haut ist hier jedoch nicht mehr fest und zusammenhängend, sondern von lockerer, leicht zum Zerfall neigender Beschaffenheit; die Schleimverbände sind nicht mehr scharf umgrenzte Gebilde, sondern von wolkig-ausbreitender Struktur. Die Nährlösung ist, besonders in den oberen Schichten, stark fadenziehend geworden. Mit Ammoniumnitrat ist nur eine schwache Trübung der Nährlösung zu erzielen; Haut- und Zooglöenbildung kommt auch nach längerer Zeit nicht zustande. Mit Kaliumnitrat schließlich bleibt eine Entwicklung völlig aus.

Reihe B über die Kohlehydraternährung zeigte, daß sich sämtliche geprüfte Verbindungen als günstig sowohl für Wachstum als auch für die Zooglöenbildung herausstellten. Besonders auffallend ist die Zooglöenhaut bei Verwendung von Maltose: die Verbände nehmen riesige Ausmaße an (Abb. 11). Am wenigsten gut ist die Entwicklung mit Zitronensäure und Stärke.

Zusammenfassend läßt sich über die Ausnutzung der Nährstoffe kurz folgendes sagen: Das Bact. herbicola bildet bei Anwesenheit der einfacheren Kohlehydrate, ohne Bevorzugung einer spezifischen Kohlenstoffverbindung, reichlich Schleim, der zur Bildung von charakteristisch geformten Zellverbänden führt. Jedoch ist die Bildung der Zooglöen auch nicht von einer gesondert zugesetzten Kohlenstoffquelle abhängig, vielmehr scheint eine Stickstoffverbindung zu genügen, wenn sie nur ein angreifbares C-Atom enthält. Allerdings ist die Menge des gebildeten Schleimes ohne besondere, gut ausnutzbare Kohlenstoffquelle so gering, daß sie makroskopisch nicht in Erscheinung tritt. Andererseits sind aber zur guten Verwertung von Kohlehydraten gleichzeitig organische Stickstoffverbindungen oder Ammoniumphosphat erforderlich. Nitrate können nicht ausgenutzt werden.

2. Enzymatische Leistungen.

a) Die kohlehydratspaltenden Enzyme.

Für die Zerlegung der verschiedenen Kohlehydrate in ihre einfachen Bestandteile werden eine Reihe von spezifisch auf die besondere Struktur der betreffenden Verbindungen eingestellte, als Carbohydrasen bezeichnete Enzyme verantwortlich gemacht. Im engeren Sinne sind darunter in erster Linie die Glykoside und Oligosaccharide spaltenden Enzyme, mit Ausschluß der Polyasen zu verstehen.

Es soll nun im folgenden der Wirkungsbereich des kohlehydratspaltenden Fermentsystems für den vorliegenden Fall des Bact. herbicola

untersucht werden unter Heranziehung einer Anzahl von verschiedenen Verbindungen. Es ist in der bakteriologischen Praxis üblich, die hydrolytische Zuckerspaltung durch den Nachweis der im weiteren Verlauf des Abbaus aus den einzelnen Monosacchariden entstandenen Säure vermittels eines geeigneten Indikators festzustellen. Jedoch ist zu beachten, daß es sich hierbei um zwei verschiedene Vorgänge handelt, nämlich erstens um die Hydrolyse der betreffenden Zucker und zweitens um den weiteren desmolytischen Abbau der durch die Hydrolyse entstandenen Monosen, in dessen Verlauf die Säure entsteht. Es muß daher hervorgehoben werden, daß es sich bei den Betrachtungen in diesem Kapitel stets nur um die hydrolytischen Enzyme handelt, während der weitere Abbau zur Säure zum Nachweis der vorher stattgefundenen Hydrolyse dient. Ein hydrolytischer Abbau kann chemisch nur durch die Bildung direkt reduzierender Monosaccharide erbracht werden; da aber die Fähigkeit der Säurebildung aus Monosacchariden (Tab. 1) erwiesen ist, muß dieselbe auch im Anschluß an die Hydrolyse stattfinden. Die Anwesenheit von hydrolysierenden Enzymen kann daher anstatt auf direktem auf dem indirekten biologischen Wege durch die Säurebildung nachgewiesen werden.

Die Versuche wurden angestellt mit dichten Aufschwemmungen lebender Bakterien. Die Vorzüchtung erfolgte auf neutralem Hefewasseragar als einem optimal günstigen Nährboden. Der Versuchsansatz geschah sodann folgendermaßen:

1. 2,0 ccm Aqua dest.
2. 0,5 ccm Phosphatpuffer ($p_H = 7,0$).
3. 1,0 ccm des zu prüfenden Kohlehydrats (2proz. mit Toluol entkeimte Lösung).
4. 1,0 ccm Bakterienaufschwemmung (ca. 20^9 Zellen).
5. 2—3 Tropfen Lackmus-Lösung.

Die Vorzüge dieser Versuchsanordnung bestehen erstens darin, daß ein Arbeiten mit unerhitzten Lösungen ermöglicht wird, die zu prüfenden Stoffe können daher keine Veränderung erleiden; zweitens darin, daß der Ansatz an organischen Verbindungen nur das zu prüfende Kohlehydrat enthält, ohne eine Beimischung anderer, vor allem organischer Stickstoffverbindungen, die unter Umständen eine leichter zugängliche Kohlenstoffquelle darstellen könnten, als ein schwierig anzugreifendes Kohlehydrat.

Zur Prüfung auf Sterilität wurden gleichzeitig Kontrollröhrchen mit Zuckerlösung ohne Bakterienaufschwemmung angesetzt: sie blieben stets keimfrei. Zur Prüfung auf Eigensäuerung der Bakterienaufschwemmung wurde von jedem Stamm eine Kontrolle ohne Zucker angesetzt: eine Säuerung blieb in allen Fällen aus. Die Feststellung der Säurebildung und die Messung der p_H der gesäuerten Lösungen erfolgte jedesmal nach 24 Std. Die dabei erhaltenen Werte sind in der umstehenden Tab. 1 zusammengestellt. Nr. 4 ist ein gelber, Laktose nicht säuernder Stamm, Nr. 22 ein weißer, Laktose nicht säuernder Stamm, Nr. 14 und 10 sind gelbe, Laktose säuernde Stämme; es folgen zum Vergleich Bact. herbicola A Hüttig und ein gelber, gas- und säurebildender, indolpositiver Colistamm.

Zunächst sei eine Auswertung dieser Ergebnisse hinsichtlich der angewandten Methodik gegeben. Der Vergleich mit der Chinablauagar- und der Hefewassermethode geht aus der Tab. 2 hervor. Als erstes fällt die bemerkenswerte Tatsache auf, daß bei Anwendung der Methode III, nämlich der Bakterienaufschwemmung in der Zuckerphosphatlösung, bedeutend mehr

Tab. 1. Säurebildung aus Kohlehydraten.
p_H-Werte in Zucker-Phosphat-Lösung (nach 24 Std.).

Kohlehydrat	4	10	14	22	Herb. A	Coli flav.
Keimgehalt der Aufschwemmung pro Kubikzentimeter .	$5,4^{9}$	20^{9}	11^{9}	25^{9}	20^{9}	26^{9}
Dextrose	5,0	5,28	5,25	5,05	6,15	5,1
Galaktose	5,9	5,48	5,3	5,62	—	5,7
Mannose	5,3	5,24	5,65	5,2	6,58	5,08
α-methyl-d-glucosid	—	—	—	—	—	—
Maltose	5,5	5,44	5,65	6,35	6,6	5,65
Saccharose	5,25	5,44	5,5	5,8	6,25	5,68
Cellobiose	6,55	5.78	5,75	5,26	6,5	6,15
Laktose	—	5,75	6,65	—	—	5,4
Raffinose	—	—	—	—	—	—
Arabinose	5,7	5,32	5,4	6,25	—	5,55
Rhamnose	—	—	5,4	6,6	—	5,65
Xylose	5,85	5,35	5,45	5,98	—	5,25
Inulin	—	6,38	—	6,8	—	—
Dextrin	—	5,9	—	—	6,34	6,65
Stärke	6,5	5,95	—	—	6,6	—
Mannit	5,4	5,16	5,45	5,25	6,65	5,85
Dulcit	—	—	—	—	—	6,05
Inosit	—	—	—	—	—	—
Glyzerin	—	—	—	—	—	6,85
Kontrolle	6,8	7,05	6,9	7,0	7,1	7,1

Kohlehydrate angegriffen werden, als bei der Prüfung nach den Methoden I und II. Das unterschiedliche Verhalten der Bakterien in den drei verschiedenen Medien betrifft vor allem die schwerer zugänglichen Kohlehydrate wie Cellobiose, Pentosen und Polysaccharide. Die Chinablauagarmethode versagt in diesen Fällen vollkommen; wie die Feststellung der Wasserstoffionenkonzentration von unbeimpften Platten im Vergleich zu den beimpften zeigt, ist dies Versagen auf das Vorwiegen der Alkalibildung zurückzuführen, welche die entstehende Säure sofort wieder neutralisiert. Der unbeimpfte Nährboden wies einen p_H-Wert von 6,35 auf, die beimpften einen solchen von 7,4 bis 7,65 bei Verwendung der erwähnten, schwerer angreifbaren Verbindungen; ferner ist daran zu denken, daß die Anwesenheit von Pepton die Spaltung schwer zugänglicher Kohlehydrate unnötig machen kann; eine dritte Erklärung für das Versagen der Chinablauagarplatte kann unter Umständen durch eine Reduktion des Farbstoffes gegeben sein; beim vorliegenden Untersuchungsmaterial dürften jedoch nur die beiden erstgenannten Ursachen in Frage kommen, da die reduzierenden Eigenschaften beim Bact. herbicola nur sehr schwach sind.

Ebenso unsichere Ergebnisse wie mit der Chinablauagarplatte werden bei der Züchtung in Hefewasser erhalten; in manchen Fällen mußte festgestellt werden, daß sogar bei Benutzung von Hefewasser desselben Herstellungsdatums mit ein- und demselben Zucker sowohl negative als auch positive Resultate erhalten wurden, wenn die Reihe noch einmal angesetzt wurde. Gegenüber der Methode III ist auch hier die Zahl der gesäuerten Kohlehydrate geringer.

Entgegengesetzt liegen jedoch die Verhältnisse, wenn Glyzerin als Kohlenstoffquelle benutzt wird: während hier die Methode III ein negatives

Tab. 2. Säurebildung aus Kohlehydraten.
Prüfung nach 3 verschiedenen Verfahren mit Stamm 4, 10, 22, 14, Herb. A, Coli flavum.

Kohlehydrat	I Chinablau-agarplatte	II Hefewasser	III Bakterien-aufschwemmung in Zucker-phosphatlösung
Dextrose	+	+	+
Mannose	—	+	+
Galaktose	—	+	+
Saccharose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Laktose	4, 22, Herb. A — 10, 14, Coli +	4, 22 — 10, 14, Herb. A, Coli +	4, 22, Herb. A — 10, 14, Coli +
Cellobiose	—	wechselnd	+
Raffinose	—	—	—
Arabinose	—	wechselnd	+
Rhamnose	—	—	4, 10, Herb. A — 22, 14, Coli +
Xylose	—	wechselnd	+
Inulin	—	—	4, 14, Herb. A, Coli — 10, 22 +
Dextrin	—	—	4, 22, 14 — 10, Herb. A Coli +
Stärke	—	—	14, 22, Coli — 4, 10, Herb. A +
Mannit	+	+	+
Dulcit	—	—	—
Inosit	—	—	—
Glyzerin	+	+	—

Ergebnis zeigt, muß die Säurebildung nach den Methoden I und II als vorhanden bezeichnet werden; danach scheint es, als ob bestimmte Stickstoffverbindungen für einen Angriff bestimmter Kohlehydrate notwendig sind.

Auf Grund dieser Feststellungen muß betont werden, daß ein Vergleich einer Reihe von Kohlehydraten bezüglich ihrer Spaltbarkeit durch Enzyme nur möglich ist, wenn ein Medium benutzt wird, das außer der zur prüfenden Kohlenstoffverbindung keinerlei organische Substanzen enthält.

Werden nun der Beurteilung der kohlehydratspaltenden Fähigkeit des Bact. herbicola die mit der Methode III erhaltenen Resultate zugrunde gelegt, so ist festzustellen, daß eine beträchtliche Anzahl dieser Stoffe von dem im allgemeinen als wenig oder gar nicht säuernd bezeichneten Organismus angegriffen wird, nämlich die Monosaccharide immer, die Disaccharide außer Laktose, die Pentosen (Rhamnose auch negativ), der Alkohol Mannit und in einem Fall sogar die Polysaccharide. Von Interesse ist vor allem das Verhalten gegenüber Laktose: diese wird in der Regel nicht an-

gegriffen, nur einzelne Stämme zeigen sich zur Laktosespaltung befähigt. Nicht säuernden Stämmen konnte die Eigenschaft durch längere Milchpassage angewöhnt werden, worauf noch an anderer Stelle eingegangen werden soll. Im Sinne von Karström (18) wäre daher das laktosepaltende Enzym als sogenanntes „adaptives" Enzym aufzufassen, d. h. eines, das auf Grund vorangegangener Anpassung gebildet wurde. Die Bildung der „konstitutiven" Enzyme soll dagegen ohne Abhängigkeit von dem zufällig zur Verfügung stehenden Substrat auf jedem Nährboden geschehen, auch dann, wenn keine Verwendung dafür besteht.

Ein Vergleich der vier Herbicola-Stämme mit dem Bact. herbicola A Hüttig und dem Bact. coli flavum bezüglich des Wirkungsbereiches ihrer Carbohydrasen zeigt, daß das Bact. coli flavum mit den Herbicola-Stämmen weitgehend übereinstimmt, während beim Bact. herbicola A Hüttig wesentliche Abweichungen zu bemerken sind: die Säuremenge ist geringer und die Zahl der angreifbaren Substrate ebenfalls, vor allem bleibt die Säuerung der Pentosen und der Galaktose aus; Dextrin und Stärke hingegen können abgebaut werden, während dies beim Bact. herbicola im allgemeinen nicht der Fall ist.

Es sind jetzt noch die Angaben der Tab. 1 im Lichte der neueren Anschauungen über Wirkungsbereich und Spezifität der Carbohydrasen zu betrachten. Eine verhältnismäßig einfache und übersichtliche Darstellung finden die Enzyme der Carbohydrasegruppe auf Grund experimenteller Untersuchungen bei Weidenhagen (31). Er beschränkt die Zahl der spezifischen Carbohydrasen auf fünf und betrachtet sie als einfache Glykosidasen, deren Spezifität auf die Besonderheit des glykosidisch verknüpften Zuckers eingestellt ist. So wird dabei unterschieden zwischen der „Zuckerspezifität" (strukturelle und konfigurative Unterschiede), der „α—β Spezifität" (Asymmetrie des glykosidischen C-Atoms) und der „n—h-Spezifität", auch „Ringspezifität" (verschiedene Sauerstoffbrücke). Die Natur des glykosidischen Paarlings soll dabei belanglos sein und nur auf die Größe der Zerfallsgeschwindigkeit Einfluß haben. Auch ist es gleichgültig, ob ein Zucker mit einem Aglykon verknüpft ist, wie bei den einfachen Glykosiden, ob mit einem anderen Monosaccharidrest, wie bei den Disacchariden oder mit einem Disaccharidrest, wie bei den Trisacchariden. Nach dieser Theorie gibt es also keine spezifischen Disaccharidasen mehr, wie sie von anderen Autoren (Kuhn, Leibowitz) gefordert werden.

Wird dieses Prinzip nun übertragen auf unseren vorliegenden Fall, so ergibt sich,. daß das Bact. herbicola über folgende zuckerspaltende Enzyme verfügen muß:

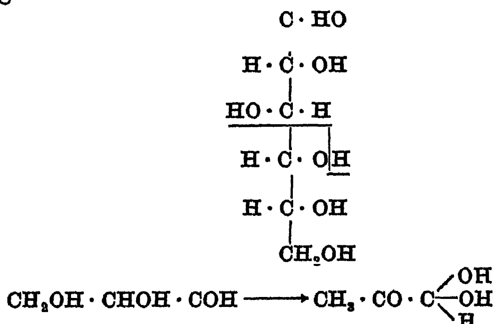
1. α-Glukosidase, da Maltose und Saccharose gespalten werden.
2. β-Glukosidase, da Cellobiose gespalten wird.
3. β-Galactosidase, nur nach Gewöhnung an Laktose.
4. α-Galaktosidase und β-h-Fructosidase hingegen müssen fehlen, da Raffinose nicht angegriffen wird. Die Saccharose kann demnach nur von der α-Glukosidase gespalten werden.

Einige Punkte lassen sich jedoch nicht mit der Weidenhagenschen Theorie in Einklang bringen:

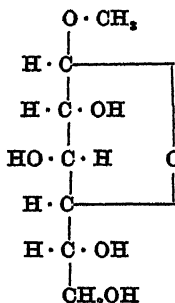
1. Für die Laktose müßten, in gleicher Weise wie für Saccharose und Raffinose, zwei Enzyme gefordert werden, die zur Spaltung des Moleküls imstande sind und zwar außer der β-Galaktosidase auch eine Glukosidase, da der Zucker aus einem Galaktose- und einem Glukoseteil besteht. Indessen

wird hierüber in den Weidenhagenschen Darlegungen nichts erwähnt. Wie schon erörtert, wird aber die Laktose von den untersuchten Stämmen nur in einzelnen Fällen, oder nach längerer Anpassung hydrolysiert, so daß eine Spaltung dieses Zuckers durch dasselbe Enzym, das die Maltose und die Cellobiose angreift, nicht wahrscheinlich ist. Bei Bact. herbicola A Hüttig liegt der Fall noch deutlicher: Laktose und Galaktose werden gar nicht angegriffen, wohl aber Maltose, Saccharose, Cellobiose. Die betreffenden Glukosidasen also, welche die letztgenannten Zucker angreifen können, vermögen nicht die Glukosekomponente der Laktose anzugreifen. An dieser Stelle befindet sich in dem Weidenhagenschen System eine Lücke.

2. Es müßte nach Weidenhagen auch das α-methyl-d-glukosid angegriffen werden, wenn dies bei Maltose und Saccharose der Fall ist. Da aber eine Säuerung desselben bei allen geprüften Stämmen nicht eintritt, kann daraus der Schluß gezogen werden, daß die das α-methyl-d-glukosid angreifende Glukosidase nicht dasselbe Enzym ist, das die Saccharose und Maltose angreift. Fraglich ist indessen, ob bei der Spaltung des α-methyl-d-glukosids wirklich Milchsäure entsteht. Nach Neuberg setzt die Milchsäurebildung das Auftreten von Methylglyoxal als Zwischenprodukt voraus, das nach den einleitenden Phasen des Zuckerabbaus durch Spaltung des Moleküls als C_3-Körper auftritt. Ein Glukosemolekül zerfällt demnach in zwei Moleküle Glycerinaldehyd, die durch innere Umlagerung Methylglyoxalhydrat ergeben:



Nun finden wir aber im α-methyl-d-glukosid an der einen Molekülhälfte eine Methylgruppe vor, deren Einfluß auf den Ablauf der Reaktion nicht ohne weiteres zu entscheiden sein dürfte.



Die Frage, ob das negative Resultat mit α-methyl-d-glukosid womöglich nur auf die angewandte Methodik zurückzuführen ist, muß daher offenbleiben.

3. Eine ganz analoge Beobachtung wie die soeben beschriebene, wird von Karström (18) mitgeteilt: sein an Maltose gewöhnter Colistamm I als Trockenpräparat führte eine deutliche Hydrolyse des Malzzuckers aus, er hydrolysierte aber nicht den Rohrzucker. Daraus schließt der Verf., daß die Spaltung des Rohrzuckers nicht von derselben α-Glukosidase bewirkt werden kann, wie die des Malzzuckers, sondern spezifische, auf die betreffenden Spaltstücke eingestellte Enzyme erfordert.

b) Die Produkte der Desmolyse.

Die aus den verschiedenen Kohlehydraten von Bact. herbicola gebildete Säure besteht zum größten Teil aus Milchsäure.

Diese konnte nach der von Barthel (1) angegebenen Methode durch Ausschütteln einer eingedampften Traubenzucker-Bouillonkultur mit Äther und durch Abdestillieren desselben als gelbes, zahflüssiges Produkt erhalten werden. Die Titration von 10 ccm einer 12tägigen Traubenzucker-Bouillonkultur zeigte den Verbrauch von 3,1 ccm · n/10 Kalilauge an. Dieser Wert, der die maximale Säuremenge darstellte, entspricht einem Milchsäuregehalt von 0,28%.

Die Wasserdampfdestillation von 500 ccm einer 5 tägigen Traubenzuckerbouillonkultur unter Zusatz von Phosphorsäure erwies das Vorhandensein von flüchtigen Säuren; die Titration mehrerer Anteile von 50 ccm des Destillats ergab einen Verbrauch von 1,8 ccm n/10 Kalilauge.

Die Gesamtsäuremenge nimmt in den ersten 24 Std. verhältnismäßig schnell zu, indem nach dieser Zeit ein Verbrauch von 2,4 ccm n/10 Kalilauge erreicht wird; wie die fortlaufende Titration zeigte, wird der maximale Wert jedoch erst in ungefähr 12 Tagen erreicht. Nach dem Verbrauch des Zuckers kommt die Alkalibildung zur Geltung und in 6 weiteren Tagen geht daher der Säuregrad bis zur deutlich alkalischen Reaktion zurück.

Aus Traubenzucker wird ferner spurenweise Gas gebildet; im Gärröhrchen ist die Entwicklung einer sehr kleinen, aber deutlichen Gasblase erkennbar. Dieselbe geringfügige Menge wurde von sämtlichen Stämmen erzeugt, während die unbeimpften Kontrollröhrchen sie nicht aufwiesen. Das Bact. herbicola A Hüttig bildet auch nicht spurenweise Gas aus irgendeinem der Zucker.

Als Hauptprodukt des Kohlehydratstoffwechsels ist demnach die Milchsäure zu bezeichnen, Nebenprodukte entstehen in nur unwesentlichen Mengen.

c) Sonstige physiologische Merkmale.

Eiweißstoffe werden von sämtlichen geprüften Stämmen nur schwach angegriffen. Im Milch und auf Milchagarplatten findet keinerlei sichtbarer Abbau statt. (Über die Bestimmung des Aminostickstoffs s. Kap. V.) Im Gelatinestich tritt indessen eine langsam fortschreitende Verflüssigung ein: nach 10 Tagen haben etwa ein Drittel der Stämme einen deutlichen Trichter zuwege gebracht, zwei Drittel der Stämme weisen nach dieser Zeit eine schmale Erweichungszone an der Oberfläche auf. Auf keinem Nährboden ist jemals ein fauliger Geruch wahrnehmbar, Ammoniak und Schwefelwasserstoff werden nicht gebildet. Das Bact. herbicola A Hüttig dagegen baut das Kasein kräftig ab und bringt eine schnelle Verflüssigung der Gelatine zustande.

Die Indolprobe, vorgenommen mit dem von Kovács modifizierten Ehrlichschen Reagens (p-Dimethylaminobenzaldehyd), fällt stets negativ aus.

Durch Peroxydzusatz kann kräftige Katalasewirkung hervorgerufen werden.

Vereinzelt ist eine schwache Reduktion von Lackmusfarbstoff zu beobachten.

Unter Benutzung der von Ohlmüller und Spitta (28) angegebenen Nährlösung (Phosphat, Dextrose, Pepton) konnte, z. T. recht deutlich, die Bildung von Acetyl-methyl-carbinol als Diacetyl nachgewiesen werden (Voges-Proskauer-Reaktion).

Im Hinblick auf die vielfach behauptete Verwandtschaft des Bact. herbicola mit der Coligruppe wurden ferner die Methylrot- und die Zitratprobe ausgeführt, die neben der Voges-Proskauer-Reaktion die amerikanische Methode zur Unterscheidung der Coli- von der Aerogenesgruppe darstellen. Ruschmann und Meyer (30) stellten bereits fest, daß diese Proben sehr wechselnd ausfallen, wenn es sich nicht mehr um typische Colivertreter handelt. Während die echten Colibakterien 1. kein Acetylmethyl-carbinol bilden, 2. in der Koserschen Zitratnährlösung nicht zu wachsen vermögen und 3. so viel Säure bilden, daß Methylrotlösung beim Zusatz zur bebrüteten Kultur in violettrot umschlägt, verhalten sich die Angehörigen der Aerogenesgruppe in allen Punkten umgekehrt. Ebenso wie die letzteren verhielten sich nun alle geprüften Herbicola-Stämme: sie bildeten Acetyl-methyl-carbinol, sie wuchsen gut in Citratnährlösung und säuerten so wenig, daß Methylrotlösung beim Zusatz zur Kultur in gelb umschlug wie bei Bact. aerogenes oder eine Übergangsfarbe zeigte. Schon an dieser Stelle muß jedoch betont werden, daß die Eigenschaften des Bact. herbicola in allen wesentlichen Punkten weit vom Charakter der Coligruppe abweichen, so daß das Ergebnis dieser Proben einen Rückschluß auf verwandtschaftliche Zusammenhänge mit der Coli-aerogenes-Gruppe nicht zuläßt.

3. Farbstoffbildung.

Die Ausbildung des gelben Pigments kommt unabhängig von Temperatur und Zusammensetzung des Nährbodens zustande. Der Farbton ist leuchtend goldgelb, ältere Kulturen tönen sich allmählich dunkler. Matt- bis rötlichgelb sind die Kulturen des Bact. herbicola A Hüttig.

Der Farbstoff ist nur in Äthylalkohol ein wenig löslich, nicht dagegen in Wasser, Äther, Petroläther, Chloroform, Benzol. Bei Behandlung einer dichten Bakterienabschwemmung mit 10proz. Schwefelsäure geht die Farbe in ein fahles Gelb über, bei Zusatz von Alkali tritt wieder der ursprüngliche goldgelbe Ton auf. Demzufolge ist auch die Farbe auf sauren Nährböden (Würzeagar) weniger intensiv als auf schwach alkalischen. Das Pigment des Bact. herbicola A Hüttig ist indessen nicht durch Säure und Alkali zu beeinflussen.

Nicht selten konnten weißwachsende Rassen des Bact. herbicola angetroffen werden; da die Kolonien aber oft wenig auffällig erscheinen, so daß sie leicht übersehen werden können, ist ihr Anteil innerhalb der ganzen Art vielleicht nicht unbeträchtlich. In allen übrigen Eigenschaften gleichen jedoch die weißen Stämme den gelben vollkommen. Das Vorkommen von weißen Abarten wird bereits von Beijerinck (2) mitgeteilt, ebenfalls haben Ruschmann und Meyer (30) 3 weißwachsende Stämme aufgefunden.

Burri und Düggeli (6) (Zürich) hingegen unterscheiden neben dem gewöhnlichen Bact. herbicola aureum ein Bact. herbicola rubrum. Diese rote Abart ist die seltenere. Desgleichen hat auch Zikes (38) (Wien) rotwachsende Rassen beobachtet, ebenfalls seltener als die gelben. Die roten Stämme sollen nach Zikes nicht die Gelatine verflüssigen und peritrich begeißelt sein. Farblose Rassen werden von den letztgenannten Autoren nicht erwähnt, während anderseits in anderen Gegenden die rote Abart nicht zu existieren scheint.

Eine vierte Farbvariation wurde im Lauf eines Jahres unter den eigenen Stämmen nur einmal gefunden. Eine ursprünglich als weißwachsend angesehene Kultur auf Milchzuckeragar hatte sich nach einigen Tagen kräftig rosa-violett gefärbt. Es wurde abermals versucht, durch Vorzüchtung, Temperatur, verschiedene Nährbodenzusammensetzung und Zusatz von $MgSO_4$ einen Einfluß auf die Pigmentbildung zu gewinnen. Aus dem in untenstehender Tabelle zusammengestellten Ergebnis geht hervor, daß anscheinend Zuckergehalt des Nahrbodens sowie eine nicht zu hohe Temperatur die Bildung des Farbstoffes begünstigen, während der Zusatz von $MgSO_4$ ohne Einfluß ist. Es unterscheidet sich der rosa-violette Farbstoff von dem gelben also dadurch, daß er erst nach einigen Tagen auftritt, daß er nur unter bestimmten Temperatur- und Ernährungsbedingungen gebildet wird, und daß er nach längerer Aufbewahrungszeit der Kultur wieder verschwindet. In allen anderen Punkten verhält sich aber dieser Stamm wie die gelben. Ein Abspalten andersfarbiger Rassen in Form von Sekundärkolonien oder Sektorenbildung kam niemals vor.

Auf Grund vorstehender Tatsachen kann die Bildung eines gelben Farbstoffes wohl als ein häufiges, nicht aber als ein unbedingt typisches Merkmal für Bact. herbicola angesehen werden.

Temperatur	Nährboden	Vorzüchtung auf		Zusatz von 0,1% $MgSO_4$
		Milchagar	Gelatine	
Zimmer-Temperatur	B. A.	weiß	weiß	weiß
	Trz. A.	rosa	rosa	rosa
	Mz. A.	rosa	rosa	rosa
	M. A.	weiß	weiß	weiß
30°	B. A.	weiß	weiß	weiß
	Trz. A.	weiß	weiß	weiß
	Mz. A.	rosa	rosa	rosa
	M. A.	weiß	weiß	weiß
37°	B. A.	weiß	weiß	weiß
	Trz. A.	weiß	weiß	weiß
	Mz. A.	weiß	weiß	weiß
	M. A.	weiß	weiß	weiß

B. A. = Bouillonagar Trz. A. = Traubenzuckerbouillonagar
Mz. A. = Milchzuckerbouillon-Agar M. A. = Milchagar

IV. Erörterung und Abgrenzung des Artbegriffs.

1. Die bisherigen Angaben über Bact. herbicola.

Winkler (34) isolierte ein zooglöenbildendes Bakterium von Pflaumenblättern und Chrzaszcz (5) denselben Organismus von Gerstenschüppchen. Beide Autoren bezeichnen ihn irrtümlicherweise als „Bac. mesentericus aureus". Auf Grund morphologisch-kultureller Angaben und nach der von Lindner übernommenen Abbildung handelt es sich hier zweifellos um Bact. herbicola. Winkler und Löhnis (25) halten die Zooglöen für besondere Kreislaufformen innerhalb des Lebenszyklus: als „Bakterioblasten" oder „Symplasma" sollen sie die Bakterien aus sich hervorgehen lassen. Diese Ansicht ist durch das Vorhergehende zur Genüge widerlegt.

Beijerinck (2) beschreibt den Organismus, den er an keimenden Pflanzensamen fand, als „Bact. agglomerans" und Frank (8) glaubt, daß sein als Erreger der Leguminosenknöllchen angesprochenes „Rhizobium leguminosarum" mit diesem und dem Bact. herbicola identisch sei.

In einer Arbeit vom Jahre 1904 berichtet sodann Düggeli (6) eingehender über einen Organismus, der an Samen und daraus gezogenen Keimpflanzen regelmäßig anzutreffen war. Er bezeichnet ihn als zweifellos identisch mit dem von Winkler von Pflaumenblättern isolierten „Bac. mesentericus aureus" und nimmt eine Umbenennung in „Bact.

herbicola“ vor, um den irreführenden Namen zu vermeiden und um das häufige Vorkommen auf Pflanzen anzudeuten.

a) Vergleich der eigenen Stämme mit Bact. herbicola B. et D.

Das Bakterium wird von Düggeli wie folgt beschrieben:

2,5 μ lange und 0,6—0,7 μ breite Stäbchen, einzeln und zu zweien. In älteren Kulturen stets Wuchsverbände, die rundliche oder langgestreckte, durch Schleim zusammengehaltene Bakterienhaufen darstellen. Lebhaft beweglich. Gramnegativ. Gutes Wachstum auf sämtlichen Nährböden unter Bevorzugung des Luftzutritts. Körnige, goldgelbe Kolonien auf der Gelatineplatte mit regellos verstreuten Zooglöen. Im Gelatinestich langsame Verflüssigung. Im Traubenzuckeragarstich reichliches Wachstum im ganzen Stich, mit glänzender Decke. Kondenswasser der Agarstrichkultur mit verschleimter Bakterienmasse erfüllt. In Bouillonkultur oberflächliche Haut. Milch entweder ganz unverändert mit goldgelber Rahmdecke oder Gerinnung ohne nachträgliche Peptonisierung. Nitrat wird reduziert. In 6 Tage alten Bouillonkulturen starke Indolreaktion.

Übereinstimmung zwischen dem Bact. herbicola B. et D. und den eigenen Stämmen kann also in folgenden Punkten festgestellt werden:

1. Standort. 2. Zellform und Beweglichkeit. 3. Verhalten bei der Gramfärbung. 4. Zooglöenbildung. 5. Verhalten auf gewöhnlichen Nährböden. 6. Farbstoffbildung. 7. Gelatineverflüssigung. 8. Verhalten gegenüber Sauerstoff. 9. Verhalten in Milch. 10. Nitratreduktion.

Abweichungeu ergeben sich lediglich bezüglich der 11. Indolbildung (jedoch ohne Angabe der zum Nachweis benutzten Reagenzien) und 12. Gasbildung (nur bei einem Stamm von Düggeli festgestellt. Gärröhrchenversuche werden nicht erwähnt, die Gasbildung kann daher leicht übersehen worden sein).

Die gute Übereinstimmung der oben gegebenen Schilderung mit den Befunden an den eigenen Stämmen erweist die Berechtigung, die letzteren als Vertreter des Bact. herbicola B. et D. anzusehen. Infolge Fehlens von Angaben kann sich der Vergleich leider nicht auf die Begeißelung und das Verhalten gegenüber Kohlehydraten erstrecken.

b) Vergleich mit den Angaben anderer Autoren.

Die von Lehmann-Neumann (22) gegebene Charakteristik hält sich im wesentlichen an die Beschreibung Düggelis; bezüglich der Säurebildung geben sie an, daß das Bact. herbicola unfähig sein soll, Dextrose, Saccharose und Maltose zu säuern, doch wollen sie es mit dem „Gelben Säurebildner“ (siehe Abschn. 4) vereinigt wissen.

Im Rahmen verschiedener Arbeiten findet sodann der Organismus bei Keipper (19), Zikes (38), Rahn (29), Ruschmann und Meyer (30) Erwähnung, doch berücksichtigen diese immer nur einen Teil der Eigenschaften.

Bestätigt wird die bisher erfolgte Beschreibung des Bact. herbicola in Punkt 1 von allen Autoren (Kap. 1), 2, 3, 4 und 6 von Keipper und Zikes, 7 und 9 von Zikes und Ruschmann und Meyer, 11 und 14 von Keipper, Ruschmann und Meyer, 12 von Rahn.

Unsicherheit besteht in Punkt 9. Bei Lehmann-Neumann und Keipper werden Milchkulturen als unverändert bezeichnet (vielleicht infolge zu kurzer Beobachtungszeit und zu niedriger Temperatur), und in Punkt 12 bei Keipper, Ruschmann und Meyer (die Bildung der sehr geringen Gasmenge kann übersehen worden sein).

Abweichungen bestehen bezüglich Punkt 10: bei Keipper und Zikes keine Nitratreduktion, und 11: bei Keipper positive Indolreaktion.

Unvollständig sind vor allem die Angaben über Begeißelung und Verhalten gegenüber Kohlehydraten. Wie die Darlegungen in Kap. III zeigen, muß aber

die Zahl der angreifbaren Verbindungen wesentlich erweitert werden. Auch bei Anwendung von Lackmushefewasser zum Nachweis läßt sich immerhin Säurebildung aus den Monosacchariden, aus Saccharose, Maltose und Mannit ermitteln.

Auf Grund der übereinstimmenden Berichte, vor allem über das Vorkommen und der für Bact. herbicola kennzeichnenden Zooglöenbildung, kann es als wahrscheinlich angesehen werden, daß auch in diesen Fällen das Bact. herbicola B. et D. zur Untersuchung vorgelegen hat. Wegen Unsicherheit und Unvollständigkeit der einzelnen Daten verlieren jedoch diese Beschreibungen für eine Charakteristik der Bakterienart an Bedeutung.

c) Vergleich mit dem Bact. herbicola A Hüttig.

Stark abweichende Eigenschaften weist indessen, wie bereits erwähnt, die von Hüttig (14, 1) als Bact. herbicola bezeichnete Bakterienart auf.

Es unterscheidet sich dies Bakterium nach Hüttigs Beschreibung sowie nach eigenen Feststellungen von den oben besprochenen Stämmen in Punkt 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12 und 13. Gelatine wird nämlich sehr schnell verflüssigt und Milch stark peptonisiert und auch wesentlich schneller koaguliert. Zooglöenbildung und schleimiges Wachstum fehlen gänzlich. Übereinstimmung mit den eigenen Stämmen besteht nur in bezug auf Beweglichkeit und Bildung eines gelben Farbstoffes. Auch für die Annahme, daß das Hüttigsche Bact. herbicola als eine Kreislaufform des gewöhnlichen Stäbchenbakteriums zu betrachten sei, ließen sich keinerlei Anhaltspunkte finden. Somit ist dieser Organismus als eine ganz andere Bakterienart von der ferneren Betrachtung auszuschalten.

2. Typenkennzeichnung des Bact. herbicola.

Auf Grund der Untersuchungen an 28 Stämmen verschiedener Herkunft und in Übereinstimmung mit der Beschreibung Düggelis läßt sich das Bact. herbicola folgendermaßen charakterisieren:

Stark bewegliche, zweigeißelige, gramnegative Kurzstäbchen.

Große Neigung zur Schleim- und Zooglöenbildung, insbesondere auf zuckerhaltigen Nährböden.

Bildung eines leuchtend gelben, wasserunlöslichen Farbstoffes, der unabhängig von Temperatur und Nährbodenzusammensetzung entsteht. Seltener in farblosen oder andersfarbigen Varietäten vorkommend.

Fakultativ anaerob.

Gelatineverflüssigung langsam, kein sichtbarer Abbau von Milcheiweiß, keine Bildung von NH_3 und H_2S.

Dicklegung der Milch durch Lab, optimal bei 37° (4—10 Tage).

Säurebildung aus Monosacchariden, Disacchariden (Laktose aber nur selten), aus Xylose, Arabinose, Mannit, nicht aus Polysacchariden.

Hauptmenge der Säure bestehend aus Milchsäure, daneben flüchtige Säuren; spurenweise Gas aus Dextrose.

Nitratreduktion, Katalase, Acetyl-methyl-carbinol positiv.

Indolbildung negativ.

Optimum zwischen 18° und 30°; auch bei 3° noch wachsend.

Bewohner von lebendem und totem Pflanzenmaterial.

3. Vergleich mit anderen Gelbstämmen.

Gelbwachsende, kurzstäbchenförmige Bakterienstämme mit Bewegungsvermögen finden sich in großer Zahl unter verschiedenen Namen in der Literatur erwähnt. Die bisher einigermaßen vollständig beschriebenen Formen sind in der Systematik von Bergey (3) unter der Bezeichnung „Flavobakterium" in einer großen Gruppe zusammengefaßt, zu welcher allerdings auch unbewegliche Stäbchen gehören. Für einen Vergleich mit Bact. herbicola wurden die polar begeißelten Angehörigen dieser Gruppe herangezogen. Unter diesen kommen für eine Identität mit Bact. herbicola von vornherein nicht in Frage.

Flavobact. ochraceum. Gründe: Lackmusmilch wird gleichzeitig alkalisch und schleimig. Indolbildung positiv, Nitratreduktion negativ. Bildung von H_2S.

Flavobact. lasseuri. Schnelle Gelatineverflüssigung; Bildung eines blauen Farbstoffs; indolpositiv.

Flavobact. fermentans. Gasbildung aus Dextrose, Laktose und Stärke. NH_3- und H_2S-Bildung.

Flavobact. turcosum. Farbstoff gelbgrün; keine Gelatineverflüssigung; Auflage auf Kartoffel trocken; träge Eigenbewegung; keine Nitratreduktion.

Flavobact. cerevisiae. 4—6 polare Geißeln; beträchtliche Gasbildung aus Dextrose. Keine Gelatineverflüssigung.

Flavobact. xanthum. Indolpositiv; Stärkehydrolyse.

Auch folgende Flavobakterien mit unbekannter Begeißelung kommen nicht in Frage:

Flavobact. acetylicum. Gründe: Grampositiv; Peptonisierung der Milch; Stärkehydrolyse; keine Nitratreduktion.

Flavobact. aurantinum. Milch durch Säure koaguliert.

Für die Beurteilung der Formen „caudatum" und „annulatum", die nach der Beschreibung Bergeys dem Bact. herbicola in ihren Eigenschaften am nächsten kommen, wurde die Originalliteratur herangezogen: Nach den Angaben von Wright (37) ist ebenfalls als von Bact. herbicola wesentlich verschieden anzusehen:

Flavobact. caudatum. Gründe: Unbewegliche Stäbchen (nach Bergey beweglich); schwaches oder fehlendes Wachstum im Stich; kein Wachstum mehr bei 35°; Stärke wird angegriffen;

und nach den Angaben von Wright und Zimmermann (39) auch:

Flavobact. annulatum. Schwaches oder fehlendes Wachstum im Stich; Entfärbung von Lackmusmilch und Bildung eines festen Koagulums; kein Wachstum mehr bei 35°; kaum wahrnehmbare Schicht auf Kartoffel und sehr geringe Farbstoffbildung (blaßgelb).

Bei keinem der Stämme wird Zooglöenbildung erwähnt; fast alle werden als Wasserbakterien bezeichnet.

Indessen liegt über das Flavobact. trifolii eine eingehende Studie von Huß (16) vor, der diesen Organismus erstmalig als „Pseudomonas trifolii nov. spec." beschrieb, und aus der eine weitgehende Übereinstimmung in wesentlichen Punkten mit dem Bact. herbicola hervorgeht. Auch von Wolff (36) werden einige Angaben gemacht und der Organismus von ihm „Bact. trifolii" benannt.

Die von Bact. herbicola abweichenden Eigenschaften beziehen sich auf die Angabe von nur einer Geißel (doch herrscht in dieser Frage häufig Unsicherheit), und auf die Indolprobe, die von Huß mit KNO_3 und 10 proz. H_2SO_4 ausgeführt wurde, also nicht vergleichbar ist mit der Probe von Kovács. Die nachträgliche langsame Peptonisierung der Milch, das reichlich hohe Temperaturoptimum und die gelegentliche Volutinbildung bleiben demnach als Unterschiede bestehen. Außer den vielen übereinstimmenden Merkmalen sprechen die Erzeugung eines süßlichen Aromas auf der Plattenkultur und der bittere Geschmack der Milchkultur, sowie vor allem

das Vorkommen auf Pflanzenmaterial für eine Identität mit Bact. herbicola. Wolff bezeichnet das Bact. trifolii direkt als Leitorganismus der Weideflora und hält beide, trifolii und herbicola, für Rassen einer Art. Bezüglich der Zooglöenbildung muß auf die Feststellung verwiesen werden, daß diese häufig erst nach einiger Zeit auf zuckerhaltigen Nährböden zur Beobachtung kommt, mithin also leicht übersehen werden kann.

Das Flavobact. trifolii ist also als einziges in dieser Gruppe mit dem Bact. herbicola identisch bzw. eine Abart von ihm.

Weiterhin wurde ein Vergleich mit denjenigen Vertretern der pflanzenpathogenen Pseudomonasarten (Phytomonasgruppe von Bergey) angestellt, die einen gelben Farbstoff bilden. Es ergab sich, daß hier keinerlei Beziehungen zu Bact. herbicola bestehen. Vor allem weichen die gelben Phytomonasarten durch ihr bedeutend stärkeres peptisches Vermögen, ihre Fähigkeit, NH_3 und H_2S zu bilden, ihr häufiges Reduktionsvermögen, Stärkeabbauvermögen und die öfter zu beobachtende Säurebildung aus Laktose von den Herbicola-Stämmen ab.

Schließlich ist noch eine dritte Gruppe von gelbwachsenden Bakterien auf ihre Beziehungen zum Bact. herbicola hin zu betrachten, und zwar handelt es sich um die Sammelgruppe der „Schleimbakterien in Bier und Würze". Zwar liegen über diese Formen nur recht spärliche Angaben, besonders physiologischer Art, vor, doch scheint es auf Grund besonders charakteristischer Daten sehr wohl möglich, daß sich unter den „Würzebakterien" häufig auch das Bact. herbicola verbirgt.

Der bestbeschriebene Organismus unter ihnen ist „Bac. flavus Fuhrmann" (als „Flavobact. flavum" von Bergey mit zu den peritrich begeißelten Angehörigen der Gruppe gestellt).

Im ganzen sind jedoch die Angaben von Fuhrmann (9) kaum ausreichend, um eine Beziehung zum Bact. herbicola behaupten zu können, wenn eine solche Möglichkeit auch nicht ganz von der Hand zu weisen ist.

Für ein Bakterium aus Bier und Würze, als Askobact. luteum Babes von Lindner (24, 1) angeführt, werden Schleim- und Zooglöenbildung als hervortretende Merkmale angegeben, ebenso wird erwähnt, daß Würze stark fadenziehend wird. Weitere Mitteilungen fehlen indessen, so daß eine Identifizierung des Bakteriums unmöglich ist.

Würzebakterien werden ferner in mehreren Abbildungen im Atlas von Lindner (24, 2) dargestellt:

Die Bilder 524 und 525 zeigen Bakterienkolonien aus der Trubsackwürze: die hier wiedergegebenen kompakten Zellmassen entsprechen genau der Zooglöenhaut in Maltosenährlösung (Abb. 11). Abbildung 528 im Atlas stellt Kettenbildung von Würzebakterien dar; diese wird ebenfalls, wie erwähnt, von Bact. herbicola in Würze hervorgerufen. Die Ähnlichkeit mit der Zellform des Bact. herbicola geht aus Abb. 563 des Atlas hervor. Typische Zooglöen schließlich zeigen die Abb. 564, 565, 567.

Es kann also nach diesen Hinweisen vermutet werden, daß unter der Sammelgruppe der „Würzebakterien" vielleicht gar nicht selten sich auch das Bact. herbicola befindet, um so mehr als, wie bereits dargelegt wurde, dies Schleimbakterium als Bewohner der Getreidekörner und des Gerstenmalzes bekannt ist; doch ist auf Grund der ungenügenden Beschreibungen die Identifizierung mit einem bestimmten Organismus unmöglich. Aus diesem Grunde dürfte es sich daher empfehlen, die genannten Arten überhaupt einzuziehen.

4. Abgrenzung gegenüber der Coligruppe.

Lehmann und Neumann (22) stellen das Bact. herbicola in die Nähe der Coligruppe; wie schon erwähnt, glauben sie den Organismus mit dem „Gelben Säurebildner Levy" vereinigen zu können, der seinerseits unter der Gruppe: „Coli und verwandte Arten" aufgezählt wird. Der einzige Unterschied von den gelben Colibakterien soll in der Unfähigkeit des Bact. herbicola, Dextrose, Saccharose und Maltose zu säuern, bestehen sowie in seiner Neigung zur Zooglöenbildung.

Hüttig (14, 2) ist gleichfalls der Meinung, daß das Bact. herbicola Beziehungen zu dieser Gruppe habe, wie aus seinen Umwandlungsversuchen hervorgeht. Ebenso finden noch einige andere Autoren Zusammenhänge zwischen mancherlei Übergangsformen, die teils dem Bact. coli, teils dem Gelben Säurebildner näherstehen.

Rahn (29) äußert sich dahingehend, daß das Bact. herbicola aureum zu den verflüssigenden Gasbildnern zu rechnen sei, zu denen ebenfalls das Bact. vulgare, Bact. prodigiosum und einige Wasserbakterien gehörten. Die meisten der verflüssigenden Gasbildner hätten mit Coliarten viel Ähnlichkeit.

a) Die Hüttigschen Umwandlungsversuche.

Hüttig geht von der Beobachtung aus, daß sich auf frischem, grünem Pflanzenmaterial niemals Milchsäurestreptokokken nachweisen lassen, höchstens durch tagelange Anreicherung unter besonderen Bedingungen; vielmehr war auf den in Wangen (Allgäu) untersuchten Pflanzen eine die Gelatine verflüssigende Coliart sehr häufig. Bei der Kaltvergärung von Sauerfutter hingegen, die in Reagensglasversuchen nachgemacht wurde, waren im vergorenen Endprodukt Milchsäurestreptokokken regelmäßig zu finden. Hüttig nimmt daher an, daß diese Formen durch Umwandlungen aus den coliähnlichen Bakterien hervorgegangen sein müssen und versucht, durch chemische und mechanische Einwirkungen solche Umwandlungen künstlich hervorzurufen. Es sollte dies gelungen sein:

1. Durch Erhitzen 24 stündiger Schrägagarkulturen in wässeriger Aufschwemmung auf 58° nach der Kuhnschen Methode.

2. Durch Behandlung der Kulturen mit Ammoniaklösungen von verschiedener Konzentration.

3. Durch Alternlassen der Kulturen.

Dabei will er aus den Coliformen neun verschiedene Wuchsformen erhalten haben, unter ihnen ein Bact. herbicola mit folgenden Eigenschaften:

Rötlich-ockergelbes Wachstum in glänzenden und schleimigen Kolonien; Milch bleibt unverändert; Gelatine wird verflüssigt; aus Trauben- und Milchzucker wird deutlich Säure, aber kein Gas gebildet; die Stäbchen sind kurz und dick mit 3—5 peritrichen Geißeln. Durch Ammoniakbehandlung sollte aus diesen ockergelben Kolonien eine zweite Wuchsform des Bact. herbicola gewonnen worden sein, indem sich Sekundärkolonien von grünlich-gelber Farbe abspalteten, die folgende Eigenschaften aufwiesen: Milch wird unter Gasbildung koaguliert, Gelatine verflüssigt, aus Traubenzucker reichlich, aus Milchzucker etwas Gas gebildet. Die Stäbchen sind deutlich länger und schlanker und haben eine größere Beweglichkeit; außerdem werden die wurstförmigen Zooglöen gebildet.

In einer weiteren Arbeit berichtet derselbe Verfasser über die Umwandlung des Bact. herbicola in den Str. lactis (Lister) Löhnis. Durch die erwähnte Erhitzungsmethode will er einen Sammlungsstamm des Str. lactis in das Bact. herbicola übergeführt haben; durch Alternlassen und anschließend erneute Erhitzung sollte dann die Rückverwandlung in den Str. lactis vor sich gegangen sein. Dasselbe Ergebnis will Hüttig mit zahlreichen, von verschiedenen Standorten isolierten Stämmen des Bact. herbicola erreicht haben; im ganzen beschreibt

er wieder acht verschiedene Wuchsformen, die er zum Kreislauf des Str. lactis rechnet. Wörtlich schreibt er:

„Nach den vorliegenden Untersuchungen also ist der Str. lactis nur die Kugelkettenform des Bact. herbicola, und umgekehrt das Bact. herbicola die Stäbchenform des Str. lactis."

Aus diesen Befunden würde also hervorgehen, daß mehrere, als selbständig bekannte Bakterienarten, durch mancherlei Zwischenglieder, die unter besonderen Bedingungen auseinander hervorgehen können, zu einem Kreislauf zusammengeschlossen sind. Solche Beziehungen würden, wenn sie wirklich beständen, wissenschaftlich wie praktisch von außerordentlichem Interesse sein. Angaben in der Literatur, die diese Versuche Hüttigs bestätigen, wurden nicht gefunden; dagegen wird in zwei Arbeiten eine negative Einstellung geäußert.

1. Klieneberger (20) kritisiert vor allem das von Hüttig angewandte Plattenausstrichverfahren. Sie hält derartige Formen für leicht vorkommende Luftinfektionen. In einer Erwiderung tritt Hüttig dieser Ansicht entgegen.

2. Ruschmann und Meyer (30) wiederholten die Erhitzungsversuche Hüttigs an ihren von Pflanzen isolierten Colistämmen und berichten von einem durchaus negativen Ergebnis. Auch die Zwischenformen, die Hüttig erreicht haben will, konnten sie nicht erhalten.

Folgende Versuche Hüttigs wurden sodann mit den eigenen Stämmen nachgeprüft:

Erstens fand Erhitzung von acht Herbicola-Stämmen verschiedener Herkunft statt nach der von Hüttig angewandten Kuhnschen Methode. Der Versuch verlief völlig negativ, denn meistens führte die Temperatur von 58° zur Abtötung sämtlicher Keime; die hin und wieder eine 5—10 Min. dauernde Erhitzung überlebenden Zellen wiesen den unerhitzten gegenüber keine Unterschiede auf.

Zweitens wurde der von Hüttig isolierte, als Bact. herbicola A bezeichnete Stamm derselben Behandlung unterzogen: die Bakterien erwiesen sich nach der Erhitzung zwar als geschwächt, was in einem gehemmten Wachstum zum Ausdruck kam, jedoch nicht als verändert.

Schließlich kam die Ammoniakbehandlung an vier Stämmen, darunter auch an Bact. herbicola A zur Anwendung: die Zellen wurden dadurch im Wachstum behindert und die Beweglichkeit wurde herabgesetzt; eine Änderung der Zellform und der physiologischen Eigenschaften konnte dagegen nicht beobachtet werden.

So kann die Annahme Hüttigs, daß das Bact. herbicola durch Umwandlungsformen mit anderen Bakterienarten (Angehörigen der Coligruppe und Str. lactis) in Zusammenhang stehe, nicht bestätigt werden.

b) Die coliartigen Übergangsformen.

Holliger (13) und Lovy (23) fanden in spontan gärenden Teigen 4 Arten von fakultativ anaeroben, nicht sporenbildenden, beweglichen Kurzstäbchen und zwar:

1. Bact. coli (peritrich begeißelt, nicht verflüssigend),
2. Bact. coli var. albidoliquefaciens (weißer Gasbildner: peritrich, schwach verflüssigend),
3. Bact. col var. luteoliquefaciens (gelber Gasbildner: peritrich, schwach verflüssigend, langsam gelb),
4. Gelber Säurebildner (keine Gasbildung, deutlich verflüssigend, schnell und intensiv gelb).

Diese Reihe entfernt sich allmählich vom Typ des Bact. coli commune, indem Gas- und Säurebildung geringer werden, bzw. ganz verschwinden und Farbstoffbildung sowie Gelatineverflüssigung hinzukommen und stärker werden.

Ähnliche Typen wurden von Ruschmann und Meyer (30) auf grünen Pflanzen gefunden, und zwar neben den drei ersten der vorgenannten noch folgende: Bact. coli anindolicum, Bact. synxanthum Ehrenberg, Bact. flavum, Bact. herbicola und Alkalibildner, so daß auch innerhalb dieser Reihe ein allmählicher Übergang erkennbar ist. Vom echten Coli bis zum Herbicola tritt der Kohlehydratstoffwechsel immer mehr zurück und der Eiweißstoffwechsel wird dafür intensiver.

Ein dritter Hinweis auf den Zusammenhang solcher coliähnlicher Organismen findet sich in einer Arbeit von Eisenberg (7). Gelbe Colivarietäten wurden durch Alternlassen der Kulturen auf ihre Veränderlichkeit geprüft. Dabei entstanden durch Variation in verschiedenen Richtungen unter anderen auch solche Formen, die als Bact. coli var. luteoliquefaciens, albidoliquefaciens und als Gelber Säurebildner Levy angesprochen wurden.

Hiernach könnte vermutet werden, daß das Bact. herbicola das Endglied einer Reihe von Übergangsformen ist, die alle zur Sammelgruppe des Bact. coli gehören; es bedürfte dann allerdings die Annahme, daß der Gelbe Säurebildner eine Rasse des Bact. herbicola sei, noch der Bestätigung. Wie aus der Typenbeschreibung des Bact. herbicola hervorgeht, sprechen jedoch mehr Gründe dafür, diesem eine gesonderte Stellung innerhalb des Systems zuzuweisen. Hinzu kommt, daß es ja auch nicht erwiesen ist, ob die erwähnten Übergangsformen wirklich in einem genetischen Zusammenhang stehen und nur infolge verschiedener Anpassungen ihre Eigenschaften abgeändert haben. Nur eine scharfe Trennung des Begriffes „Bact. herbicola“ von dem der Coligruppe wird der Eigenart des ersteren gerecht.

Die Untersuchungen in diesem Kapitel haben also ergeben, daß das Bact. herbicola B. et D., das ebenfalls in den eigenen Stämmen zur Bearbeitung vorlag, einen einheitlichen, in sich geschlossenen Bakterientyp darstellt.

Der Vergleich mit den bisher bekannten Gelbstämmen einerseits und mit der Gruppe des Bact. coli und seinen mannigfachen Übergangsformen andererseits, erweist die Berechtigung, das Bact. herbicola als eine eigene Art zu betrachten und zeigt, daß unter allen besprochenen Formen als sicher dem Bact. herbicola zugehörig und zwar als eine Abart desselben, nur das Flavobact. trifolii gelten kann. Beide Formen sind demnach zu vereinigen und der betreffende Organismus unter Zugrundelegung der Einteilung von Bergey und unter Hinweis auf die ersten Autoren und Namengeber als „Flavobact. herbicola Burri und Düggeli“ zu benennen.

V. Die Bedeutung des Bact. herbicola für die Praxis.

1. Verhalten in Milch und Milchprodukten.

a) Die Milch als Nährboden.

Die Milch bietet dem Bact. herbicola ein durchaus zusagendes Nährsubstrat, wenn auch bei weitem nicht das beste. Seine Wirksamkeit in diesem Medium hängt wesentlich von dem Umstand ab, ob der Milchzucker gesäuert werden kann oder nicht. Wie an anderer Stelle bereits dargelegt wurde, ist die Fähigkeit der Milchzuckersäuerung eine Besonderheit einzelner Stämme; im allgemeinen wird sie nicht angetroffen. Untenstehende Übersicht bringt die Ergebnisse einiger Säuregrad- und p_H-Bestimmungen von 5 tägigen Magermilchkulturen.

Stamm	S. H.	p_H	Stamm	S. H.	p_H
1	17	6,14	15	10	6,3
2	10	6,44	16	10	6,8
3	10	6,32	17	12	6,36
4	10	6,36	18	10	6,3
5	12	6,44	19	22	5,4
6	14	6,1	20	18	5,58
7	10	6,26	21	8	6,74
8	10	6,28	22	6	6,9
9	12	6,3	23	8	6,74
10	22	5,43	24	8	6,68
11	22	5,44	25	8	6,45
12	10	6,38	26	8	6,88
13	10	6,38	27	14	6,45
14	16	5,74	Kontr.:	8	6,5

Es geht daraus hervor, daß in den meisten Fällen nur unwesentliche Abweichungen von dem normalen Säuregrad der Milch hervorgerufen werden. Bei Zimmertemperatur bleibt die Milchkultur längere Zeit hindurch unverändert, auf der Oberfläche kommt es zur Bildung einer zähen, gelben Haut. Abweichend verhalten sich dagegen die Stämme mit Milchzuckersäuerungsvermögen. Die erzeugte Säuremenge ist zwar nicht besonders groß, doch findet auf Kosten des Milchzuckers außerdem eine starke Schleimbildung statt; besonders in den oberen Schichten entwickelt sich eine glasige, zähe Masse. Eine Fällung des Kaseins durch Säurewirkung konnte nur bei verhältnismäßig frisch isolierten Stämmen festgestellt werden; die Schleimbildung war in diesen Fällen nur ganz unerheblich.

In Magermilch mit Dextrose- oder Maltosezusatz sind sämtliche Stämme zur Schleimbildung befähigt, eine erneute Bestätigung dafür, daß das assimilierbare Kohlehydrat dazu notwendig ist.

Es lag nun der Gedanke nahe, ob nicht den gegenüber Milchzucker indifferenten Stämmen durch fortgesetzte Züchtung in Milch, wo ihnen kein anderes Kohlehydrat zur Verfügung steht, die Säurebildung aus Milchzucker langsam angewöhnt werden könnte. Durch 8—10 tägiges, regelmäßiges Umimpfen in neue Lackmusmilchröhrchen gelang es in der Tat, im Verlauf von 3—5 Monaten eine zunehmende Säure- und gleichzeitige Schleimbildung zu bewirken. Es wurden zu diesem Versuch die Stämme 3, 8, 18 benutzt, die, wie aus der Tabelle hervorgeht, vor der Gewöhnung an Milchzucker nur die sehr bescheidenen Werte von 6,3, 6,28, 6,32 p_H in der Milch hervorzurufen vermochten. Nach 4 Monaten ununterbrochener Milchpassage hingegen wurden die Werte von 6,25, 5,45, 5,5 p_H erreicht. Es zeigte sich dabei, daß die Gewöhnung nicht bei allen Stämmen im gleichen Tempo vor sich geht: bei Stamm 3 hatte sie kaum merkbare Fortschritte gemacht, während sie bei Stamm 18 in wenigen Wochen erfolgt war. Gleichzeitig wurde die Milch durch die Stämme 8 und 18 stark fadenziehend.

Andererseits scheint aber das Vermögen der Milchzuckersäuerung auch wieder verlorengehen zu können. Der säuernde Stamm 10 zeigte eines Tages, nachdem er längere Zeit unbenutzt aufbewahrt worden war, auf der Gußplatte mit Chinablaumilchzuckeragar säuernde und nicht säuernde Kolonien. Die Säurebildung in Magermilch erfolgte wesentlich langsamer als früher.

Die Eiweißstoffe der Milch werden von sämtlichen Stämmen nur in ganz geringem Maße angegriffen. Auf Milchagarplatten ist keinerlei Abbau festzustellen; in Milch läßt sich nach einigen Tagen ein unangenehm bitterer Geschmack wahrnehmen, obwohl eine erkennbare Peptonisierung nicht stattfindet. Die meisten Stämme rufen ferner, jedoch nur bei höherer Temperatur, Labgerinnung hervor. Werden 50 ccm Magermilch mit ca. 1 ccm Bouillonkultur beimpft, so ist Labwirkung bei 37° in 4—6 Tagen festzustellen; bei 30° kommt es nicht immer oder langsamer zur Gerinnung der Milch. Der Säuregrad beträgt dabei im Durchschnitt 12 S. H. Eine nachträgliche Peptonisierung tritt nicht ein.

Die Bestimmung des Aminostickstoffs nach der Vorschrift von van Slyke (1) zeigte, daß ein sehr geringer Abbau der Eiweißstoffe doch stattfindet. Zur Verwendung gelangten vier Wochen alte Milchkulturen von zwei verschiedenen Stämmen. Die in der van Slykeschen Apparatur durch die Behandlung mit Nitrit und Eisessig erzeugte Menge an freiem Stickstoff betrug 3,3 und 3,4 ccm. Abzüglich des Wertes für den in der Milch von vornherein vorhandenen Aminostickstoff von 0,7 ccm ergab sich nach Umrechnung übereinstimmend für beide Stämme ein Gehalt von 3,0 mg Aminostickstoff pro 10 ccm.

Die Prüfung der Stämme auf Fettspaltungsvermögen in Vollmilchfederstrichen nach der Methode von Henneberg ergab, daß das Milchfett nicht angegriffen wird. In der Butter dürfte daher der Organismus als Schädling nicht in Frage kommen; im Käse ist sein Auftreten wegen der zu hohen Salzkonzentrationen nicht zu erwarten.

Die Dauerpasteurisierung führte bei allen daraufhin geprüften Stämmen zur Abtötung aller Keime: die mit den erhitzten Magermilchproben gegossenen Platten blieben steril.

b) Konkurrenzkampf mit Str. lactis.

Über die Entwicklungsmöglichkeiten des Bact. herbicola bei Anwesenheit einer normalen Milchflora, vor allem von Milchsäurestreptokokken in der frischen Milch, geben die folgenden Versuchsreihen Aufschluß:

Das Verhalten einer bestimmten Menge von Herbicola-Keimen gegenüber dem häufigsten Milchbakterium, dem Str. lactis, wurde geprüft:

a) durch Einbringen von 1 ccm einer 24stündigen Bouillonkultur in 10 ccm frisch eingelieferter, roher Lieferantenmilch unter gleichzeitiger Verarbeitung einer Probe ohne Zusatz von Herbicola-Keimen;

b) durch Benutzung aseptisch gewonnener und zwecks Keimfreimachung dauerpasteurisierter Milch, indem je 10 ccm einmal mit 1 ccm Lactis-Kultur allein, einmal mit 1 ccm Herbicola-Kultur allein und schließlich mit gleichen Mengen von Lactis- und Herbicola-Kultur zusammen beimpft wurden. Dadurch bot sich die Möglichkeit einer Variation insofern, als die Vermehrungsintensität von Str. lactis und Bact. herbicola sowohl gesondert, als auch im Zusammenwirken betrachtet werden konnte.

Die Bestimmung der Keimzahl fand, für Bact. herbicola und für Str. lactis gesondert, am Anfang des Versuches und nach 24 Std. Aufenthalt in Zimmertemperatur statt. In einer zweiten Versuchsreihe sodann nach 1-, 2- und 4 tägigem Aufenthalt im Kühlraum bei 6°. Für die Keimzählung kam das Verdünnungsverfahren mit Gußplatten und mit Chinablaumilchzuckeragar als Nährboden zur Anwendung. Die dunkelblauen Kolonien des Str. lactis und die gelben des Bact. herbicola

ergaben eine gute Kontrastwirkung, so daß das Auszählen mit großer Sicherheit vor sich gehen konnte.

Zimmertemperatur: ca. 20° C.

		Anfangskeimgehalt	Nach 24 Std.
Rohmilch	Lactis	100 000	12 000 000
	Lactis Herbicola	30 000 10 000	23 000 000 —
Pasteurisierte Milch	Lactis	23 000 000	3 600 000 000
	Herbicola	100 000 000	173 000 000
	Lactis Herbicola	260 000 1 840 000	1 500 000 000 —

Kühlraum: 6° C.

		Anfangskeimgehalt	Nach 24 Std.
Rohmilch	Lactis	200 000	300 000
	Lactis Herbicola	6 500 200 000	6 000 90 000 000
Pasteurisierte Milch	Lactis	15 000 000	4 000 000
	Herbicola	27 000 000	120 000
	Lactis Herbicola	22 000 000 1 000 000	10 000 000 800 000
		Nach 2 Tagen	Nach 4 Tagen
Rohmilch	Lactis	130 000	200 000
	Lactis Herbicola	— 47 000 000	— 5 000 000
Pasteurisierte Milch	Lactis	62 000 000	350 000 000
	Herbicola	37 000	4 000 000
	Lactis Herbicola	40 000 000 1 700 000	85 000 000 4 000 000

Die in obenstehender Tabelle zusammengestellten Ergebnisse der Keimzählung sind folgende:

a) Zimmertemperatur.

1. Die Vermehrung des Str. lactis in der Milch bei Zimmertemperatur innerhalb 24 Std. ist ganz beträchtlich, die des Bact. herbicola in demselben Medium, bei derselben Temperatur und in der gleichen Zeit nur eine geringe.

2. Befinden sich beide Keimarten zusammen in der Milch, so wird das Bact. herbicola bei dieser Temperatur innerhalb 24 Std. so weit von Str. lactis zurückgedrängt, daß sich seine Anwesenheit auf der Keimzahlplatte nicht mehr feststellen läßt.

3. Die Hemmung durch Str. lactis macht sich nicht nur in der Milch geltend, sondern auch auf den zur Keimzählung verwendeten Platten:

Bact. herbicola ohne Str. lactis zeigt eine weit höhere Keimzahl als mit Str. lactis zusammen, wenn man die am Anfang des Versuches ermittelten Keimzahlen betrachtet. Zweifellos ist die Hemmung auf die von Str. lactis produzierte Säure zurückzuführen. Der p_H-Wert der gesäuerten Milchprobe betrug nach 24 Std. 4,4, überschreitet also die Grenze des Wachstumsbereichs für Bact. herbicola. Der Vorteil von Str. lactis beruht auf seinem höheren Temperaturoptimum und seiner besonderen Anpassung an die Milch als Nährboden.

b) Kühlraum: 6°.

4. Bei einer Temperatur von 6° schwindet dagegen der Vorteil des Str. lactis bezüglich der Temperatur. Es macht sich jetzt die Einsaatmenge insofern geltend, als die geringe Keimzahl von Str. lactis in der Rohmilch eine Vorherrschaft des Bact. herbicola gestattet, mit dem sie in weit größerer Menge beimpft wurde. Werden jedoch annähernd gleiche Keimmengen in pasteurisierte Milch eingebracht, so hat Str. lactis einen gewissen Vorsprung, doch ist dabei zu berücksichtigen, daß während des Wachstums auf der Platte wieder die erwähnte Säurehemmung gegenüber Bact. herbicola stattfindet, so daß unter Beachtung dieser methodischen Fehlerquelle sich das Verhältnis mehr zugunsten des Bact. herbicola verschiebt.

Bezüglich der Rolle des Bact. herbicola in der Milch läßt sich also sagen, daß es als Erreger bitteren Geschmacks, seltener als Schleimbildner, die Beschaffenheit derselben in ungünstigem Sinne verändern kann. Ein Fall von bitterer Milch, hervorgerufen von Bact. trifolii, wird von Wolff beschrieben, der die Häufigkeit des betreffenden Keimes in der Milch betont. Ferner nennt Henneberg (12, 1) ebenfalls das Bact. trifolii als einen in der Milch vorkommenden Schädling.

Bei höherer Temperatur kommt durch die Milchsäurestreptokokken ein natürliches Abwehrmittel zur Geltung. Bei Kühlhaltung der Milch dagegen vermag sich Bact. herbicola neben Str. lactis zu behaupten, wenn nicht zur Vorherrschaft zu gelangen.

2. Verhalten in süßer und gehopfter Würze.

Von Zikes (38) und Hummer (15) werden Beobachtungen darüber mitgeteilt, daß die massenhaft an den Gerstenkeimlingen haftenden, Zooglöen-bildenden Bakterien in das Malz und in die Bierwürze geraten. Übereinstimmend halten beide das Bact. herbicola für den Hauptbewohner des Grünmalzes; es soll für Süßwürze und gehopfte Würze dadurch schädlich sein, daß es Schleimbildung und Trübung verursacht.

Die Vermehrung in gehopfter Würze ist jedoch, wie die Nachprüfung mit den eigenen Stämmen ergab, nur sehr bescheiden; es kommt nicht zur Schleimbildung, sondern die Zellen degenerieren und bilden Involutionsformen; es mag indessen sein, daß es in der Natur manche Rassen gibt, die die Bitterstoffe des Hopfens zu ertragen vermögen; im Konkurrenzkampf gegen gärende Hefe wird das Bact. herbicola jedoch nach einiger Zeit völlig unterdrückt. Bei zu starker Infektion soll das Bier aber hinsichtlich des Geruchs und Geschmacks Schaden erleiden. In schwach gehopften amerikanischen Bieren können die dem Bact. herbicola sehr ähnlichen Termoarten als direkte Ursache von Trübungen vorkommen.

3. Verhalten auf dem Getreidekeimling.

Mehrfach wird in der Literatur die Ansicht vertreten, daß das Bact. herbicola den Getreidekeimling zu schädigen imstande sei.

Nach Zikes (38) soll eine Reinkultur, noch mehr aber ein Zusammenwirken mit Bact. fluorescens, die Wurzeln im Wachstum behindern. Desgleichen will Morgenthaler (26) an mit Zooglöen behafteten Würzelchen gesehen haben, daß sich diese verkrümmten und einschrumpften, ja sogar ganz abstarben.

An zahlreichen Keimversuchen mit verschiedenen Getreidearten auf feuchtem, sterilisiertem Fließpapier konnten derartige Beobachtungen aber niemals gemacht werden, obwohl sämtliche, daraufhin geprüften Keimlinge eine beträchtliche Besiedlung mit diesem Organismus aufwiesen.

Auch den in der Literatur erwähnten Angaben zufolge dürfte wohl die Ansicht zu Recht bestehen, daß das Bact. herbicola der häufigste, oft sogar der alleinige Saprophyt des gesunden Getreidekorns ist.

Nach Hummer (15) ist ein großer Anteil dieses Organismus an der Getreideflora ein Zeichen für die gute Beschaffenheit des betreffenden Saatgutes, während muffiges Getreide sofort erkannt werden kann an den zahlreich auftretenden Schimmelpilzkolonien und an dem geringen Anteil, den das Bact. herbicola an der Bakterienflora hat.

Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, daß das Bact. herbicola ein harmloser Saprophyt der grünen Pflanze ist.

VI. Bact. herbicola als Pflanzenbewohner.

Über die saprophytische Flora der grünen Pflanzen liegen bereits verschiedene bakteriologische Studien vor. Es beschäftigten sich mit diesem Thema unter allgemein wissenschaftlichen Gesichtspunkten Beijerinck (2), Wöller (35), Burri (4) und Düggeli (6), indem sie die gesamte Bakterienflora einer Betrachtung unterzogen und z. T. auch die biologischen Gegebenheiten berücksichtigten.

Eine neuere Arbeit über die Bakterienbesiedlung der grünen Pflanzen während des Zeitraums von 1 Jahr liegt von Grapengeter (10) vor, der gleichzeitig die Herkunft der Keime zu ermitteln bemüht war, in dem er auch die umgebenden Medien, wie Luft und Erde, untersuchte.

Einzelne Organismengruppen wiederum sind Gegenstand der Forschung von Hüttig (14), der die Fluorescens-putidum-Gruppe einer Bearbeitung unterzog, und von Ruschmann und Meyer (30), die sich den auf Pflanzen vorkommenden coliähnlichen Bakterien zuwandten.

Zahlreiche Untersuchungen kamen schließlich auf Grund von praktischen Bedürfnissen zustande, da gerade die pflanzlichen Stoffe als Infektionsquelle für die Milch naturgemäß eine bedeutende Rolle spielen. Die Flora der Weidepflanzen wurde besonders eingehend von Weigmann und Wolff (32) studiert. Eine gewisse Übereinstimmung zwischen den Weideorganismen und denjenigen der Milch wird als unverkennbar bezeichnet. Pflanzliches Material, das mit der Milch in enge Berührung kommt, wurde auf seinen Bestand an Mikroorganismen außerdem bearbeitet von Gruber (11), der Gras, Streu, Karotten, Steckrüben einer bakteriologischen Analyse unterzog; von Wigger (33), der seine Aufmerksamkeit den Kraftfuttermitteln zuwandte; und von Kürsteiner (21), der die Streumaterialien wie Stroh, Riedstreu, Torfstreu bearbeitete. Mit Ausnahme von Gruber wird von sämtlichen Autoren das Bact. herbicola als regelmäßig vorkommender Organismus genannt. Burri und Düggeli betonen die dominierende Rolle des Bact. herbicola auf Samen und Keimpflanzen und kommen auf Grund ihrer Untersuchungen zu der Feststellung, daß die auf Keimpflanzen sich findende Bakterienflora der Hauptsache nach das Ergebnis einer während des Wachstums derselben stattgefundenen Vermehrung ist, denn sie trafen auf den Keimlingen ausnahmslos viel mehr Bakterien an als auf dem zugehörigen Saatmaterial.

Um den Organismus in seiner Eigenschaft als Pflanzenbewohner zu charakterisieren, bleiben nun folgende Fragen zu klären:

1. Stellt die grüne Pflanze den ursprünglichen und einzigen Standort

dar, an dem Bact. herbicola regelmäßig und in größerer Menge zu finden ist? Es darf dann die Besiedlung der Pflanze nicht von dem umgebenden Medium herzuleiten sein; in Luft und Erde darf es dann als nicht regelmäßiger Keim nur so weit angetroffen werden, als dies mit einer sekundären Verbreitung vereinbar ist.

2. Stellt die Pflanze das eigentliche Vermehrungssubstrat dar, von welchem die Verbreitung des Keimes ausgehen kann?

3. Lassen sich Merkmale finden, die als Anpassungserscheinungen des Organismus an das Leben auf der Pflanze zu deuten sind?

4. Welche Bakterienarten kommen neben dem Bact. herbicola auf der Pflanze vor und kann ein solches Vorkommen vielleicht ebenfalls als sehr konstant angesehen werden?

1. Die Pflanze als Lebensraum.

a) Als ursprünglicher Standort.

Der Gedanke, daß die Besiedlung der grünen Gewächse mit dem Bact. herbicola vielleicht ihren Ursprung in der umgebenden Luft und den in ihr enthaltenen Keimen haben könnte, wurde bereits von Burri und Düggeli verworfen. Diese wiesen darauf hin, daß die an grünen Pflanzen gefundenen Keimzahlen viel zu hoch seien, um als Luftinfektion angesehen werden zu können.

Um einen ungefähren Anhaltspunkt für die Besiedlungsdichte der Pflanzenoberfläche zu erhalten, wurde nach der üblichen Verdünnungsmethode mit Gußplatten die Keimzahl an 1 g Pflanzensubstanz bestimmt. Es muß bei dem Ergebnis allerdings berücksichtigt werden, daß ein Teil der Keime trotz kräftigen Schüttelns immer noch durch die Rauhigkeiten der Oberfläche festgehalten sein mag. Die Untersuchung fand Anfang und Mitte September statt.

Es ergab sich dabei als Gesamtkeimzahl für:

Heu	11,0	Millionen
Gras	13,3	,,
Klee	13,0	,,
Schachtelhalm	5,9	,,
Gras	38,0	,,
Simse	49,0	,,

Davon gehörten dem Bact. herbicola an:

Heu	3,7	Millionen	= 33%
Gras	0,3	,,	= 2%
Klee	5,6	,,	= 43%
Schachtelhalm	3,8	,,	= 63%
Gras	3,2	,,	= 8%
Simse	22,0	,,	= 45%

Je nach Witterung und Jahreszeit werden diese Zahlen natürlich schwanken; auch dürfte der Anteil des Bact. herbicola an der Gesamtkeimzahl gewiß ganz unkontrollierbaren Einflüssen unterliegen.

Als Bestätigung der Ansicht von Burri und Düggeli können ferner die Untersuchungen von Grapengeter gelten: in den 12 Monaten eines Jahres wurde das Bact. herbicola auf Luftplatten nur viermal festgestellt; das Vorkommen in der Luft wird von ihm als „unregelmäßig“ bezeichnet. Wie schon eingangs betont wurde, konnte auch bei den eigenen Nachprüfungen das Bact. herbicola als Luftkeim nur gelegentlich

beobachtet werden und nur dann in vermehrtem Maße, wenn eine Verbreitungsmöglichkeit durch Pflanzenmaterial gegeben war.

Aus allen diesen Befunden geht mit Deutlichkeit hervor, daß dies Bakterium kein gewöhnlicher Luftkeim ist, sondern daß es dort, wo es sich in der Luft nachweisen läßt, sicherlich von Pflanzenmaterial herrührt und keineswegs umgekehrt als Luftinfektion auf die Pflanze gelangt.

Eine zweite Möglichkeit der Infektion der Pflanze mit dem Herbicola-Keim wäre durch den Erdboden denkbar, aus dem er auf die Pflanze übertreten könnte. Es hat sich indessen aus den regelmäßigen Untersuchungen Grapengeters sowie aus eigenen gelegentlichen Stichproben mit Ackererde, Wiesenerde und Straßensand ergeben, daß der Keim in diesen Medien völlig fehlt.

Anhaltspunkte für einen anderen primären Aufenthaltsort als die Oberfläche der grünen Pflanze wurden weder durch eigene Beobachtungen gewonnen, noch finden sich darüber Angaben in der Literatur.

Damit kann die grüne Pflanze als der eigentliche Standort dieses Bakteriums betrachtet werden.

b) Die Pflanze als Vermehrungssubstrat.

Die Konstanz des Vorkommens, sowie der zuweilen recht bedeutende Anteil des Bact. herbicola an der epiphytischen Pflanzenflora ist ohne die Annahme einer regen Vermehrungstätigkeit auf diesem Substrat kaum zu erklären. Nach den Angaben von Düggeli beträgt die Anzahl der Herbicola-Stäbchen auf gesunden Keimpflanzen mindestens das 6fache der ursprünglich auf dem entsprechenden Saatmaterial vorhanden gewesenen. Selbstverständlich kann ein Laboratoriumsversuch niemals die natürlichen Bedingungen nachahmen, denen die Entwicklung der Bakterien auf pflanzlichem Material in der freien Natur ausgesetzt ist. Daher wurden die Versuche zur Feststellung der Vermehrungsziffer vom Samen bis zum etwa 10 cm langen Keimling unter möglichstem Ausschluß sämtlicher Faktoren vorgenommen, die das Ergebnis beeinflussen könnten. Die Samen von vier verschiedenen Getreidesorten gelangten in einer offenen Petrischale auf sterilisiertem, mit sterilem Wasser genügend angefeuchteten Filtrierpapier zum Auskeimen. Jede der Schalen wurde unter einer Glasglocke in feuchter Atmosphäre am Fenster eines geheizten Raumes aufbewahrt. Damit kam einerseits der etwaige Einfluß von Bodenorganismen in Fortfall, andererseits sämtliche Witterungseinflüsse wie Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen, Wind und Regen, so daß die Bedingungen für die Vermehrung als maximal günstig anzusehen waren. Dieser Umstand muß selbstverständlich bei der Beurteilung des Ergebnisses berücksichtigt werden; eine Beeinflussung desselben durch Luftinfektion kann unberücksichtigt bleiben: die als Kontrolle aufgestellten Luftplatten wiesen keine Herbicola-Keime auf.

Die Keimzahlbestimmungen wurden sodann unter Benutzung von zwei verschiedenen Nährböden (Chinablautraubenzuckeragar = Trz. A. und Würzeagar = W. A.) in den aufeinanderfolgenden Wachstumsstadien der Pflänzchen vorgenommen und zwar zuerst am ungekeimten Samen, danach am eben gekeimten Samen. In einem weiteren Versuch wurde die Vermehrung allein auf den oberirdischen Teilen der Keimpflanze einer Prüfung unterzogen und zwar dann, wenn die Blatteile eine Länge von 1—2, 5 und 10 cm erreicht hatten. Um keine Zufallsergebnisse zu erzielen, wurden der Unter-

suchung jedesmal 5 Hälmchen zugrunde gelegt; von den ungekeimten Samen fanden jedesmal 20 Stück Verwendung.

Das in der untenstehenden Übersicht niedergelegte Ergebnis, umgerechnet auf je ein Samenkorn bzw. eine Keimpflanze, läßt folgende Punkte als bemerkenswert erscheinen:

a) Samenkorn.

	Ungekeimt	Gekeimt	Vermehrungsziffer
Roggen:			
Trz. A.	200 000	7 000 000	35
W. A.	44 000	5 000 000	113
Gerste:			
Trz. A.	50 000	5 000 000	100
W. A.	5 000	6 000 000	1100
Hafer:			
Trz. A.	200 000	38 000 000	190
W. A.	90 000	28 000 000	310
Weizen:			
Trz. A.	60 000	1 300 000	21
W. A.	13 000	1 000 000	77

b) Blatteile.

	1—2 cm	5 cm	10 cm
Roggen:			
Trz. A.	700 000	12 000	2 000 000
W. A.	50 000	14 000	500 000
Gerste:			
Trz. A.	350 000	275 000	24 000 000
W. A.	220 000	90 000	930 000
Hafer:			
Trz. A.	300 000	130 000	900 000
W. A.	134 000	110 000	400 000
Weizen:			
Trz. A.	270 000	900 000	300 000
W. A.	100 000	600 000	100 000

1. Der Bakterienüberzug der Getreidesamen besteht bei allen vier Proben aus einer Zahl von einzelnen Zellen, die sich innerhalb enger Zahlengrenzen bewegt.

2. Ein starkes Anschwellen der Keimzahl ist beim Keimungsprozeß des Samens zu verzeichnen.

3. Nach der Tab. b) ergibt sich für die oberirdischen Teile der untersuchten Pflanzen, wenn überhaupt, nur eine sehr geringe Vergrößerung der Keimzahl, obwohl die in der beschriebenen Versuchsanordnung gewährleisteten Bedingungen dadurch sehr günstig waren, daß für einen konstant hohen Feuchtigkeitsgehalt gesorgt war. Die von Düggeli behauptete Vermehrung kann daher wohl kaum für die grünen, oberirdischen Teile gelten; es bleibt bei seinen Angaben zu beachten, daß er stets den gesamten Pflanzenkörper einer Untersuchung unterzog, ohne die grünen Teile gesondert zu betrachten.

Aber aus der ständigen Anwesenheit des Bakteriums auf den Teilen der Pflanze und aus der Tatsache, daß auch eine Besiedlung der Früchte und Samen stattfindet, kann geschlossen werden, daß die Vermehrungsperiode während der Samenkeimung ausreicht, um das Leben der Art auf seinem Substrat zu erhalten. (Über Ausbreitung des Keims auf der Pflanzenoberfläche s. Abschn. c.) Als Vorbedingung für eine solche Vermehrungsperiode sind das Vorhandensein von Wasser und das Auftreten größerer Mengen von Nährstoffen, wie dies bei der Samenkeimung ja der Fall ist, anzusehen. Es sind dies vor allem die Spaltprodukte der Stärke, Maltose und Glukose, sowie große Mengen von Asparagin. Vielleicht ist die Beobachtung, daß Wachstum und Schleimbildung des Saprophyten auf maltosehaltigen Nährböden ganz besonders ausgeprägt ist, keine Zufälligkeit. Ferner sind die Wurzeln imstande, Äpfelsäure und andere organische Stoffe, auch Zucker, in das umgebende Medium abzusondern. Hiermit wäre jedenfalls die sonst schwer zu erklärende Tatsache in Einklang zu bringen, daß sterilisierte, anorganische Nährlösung durch Bakterienentwicklung stark getrübt wird, wenn man angekeimten Samen in ihr wachsen läßt.

Die Versuchsanordnung war folgendermaßen gewählt:

Die Kulturflasche mit der nur anorganische Salze enthaltenden Nährlösung war mittels einer durchbohrten, sterilisierten Pappscheibe gegen Luftinfektion geschützt. Der Keimling wurde durch die Durchbohrung so geführt, daß seine Wurzeln die Nährlösung erreichten. Nach achttägiger Versuchsdauer ließ sich in diesen Nährlösungen ein Keimgehalt von annähernd 50 Millionen im Kubikzentimeter feststellen; der größte Teil der Keime bestand aus den Zellen des Bact. herbicola.

Verwunderlich ist jedoch angesichts dieser Erscheinung, daß sich der Organismus im Erdboden nicht nachweisen läßt, obwohl er alljährlich durch die keimenden Samen unzähliger Pflanzen in ihn übergehen muß. Es dürfte daraus zu entnehmen sein, daß im Konkurrenzkampf mit den Bodenorganismen eine radikale Unterdrückung des Bact. herbicola stattfindet. Im Gegensatz dazu wird von Düggeli behauptet, daß der Keim in den Boden vorzudringen vermag und die vorhandene Flora zum Teil zu verdrängen imstande ist. Aus den Angaben des Autors läßt sich jedoch nicht entnehmen, ob sich die Bakterien auch ohne die Möglichkeit dauernder Neueinwanderung von den Wurzeln aus im Erdboden halten können.

c) Merkmale, die für das Leben auf der Pflanze von Bedeutung sind.

In erster Linie ist hier die Fähigkeit der Schleimbildung zu nennen. Die Funktion der Schleimhülle ist nach zwei Richtungen hin denkbar: Einerseits dürfte sie zur Festheftung des Bakterienbelages an der Unterlage geeignet sein, andererseits ist sie ohne Zweifel als Schutz vor Wasserentzug zur Überstehung längerer Trockenperioden anzusehen. Die größten Anforderungen bezüglich des Ertragens von Trockenheit werden sicherlich in der Zeit zwischen Samenreife und neuer Keimung der Pflanze gestellt; nur so ist dank der Lebensfähigkeit auf den trockenen Samen die Übertragung dieser Keimart auf die neue Pflanzengeneration denkbar. Durch einen einfachen Versuch sollte geprüft werden, wie lange die Zellen in eingetrocknetem Zustande lebensfähig bleiben.

In Form von Bouillon- und Würzekulturen wurden die Bakterien auf schmale Streifen sterilisierten Filtrierpapiers gebracht, die in geschlossener Petrischale langsam eingetrocknet wurden. Wöchentlich geschah die Prüfung auf den Lebenszustand der Zellen durch Einbringen eines dieser Streifen in geeignete Nährflüssigkeit.

Nach ungefähr 12 Wochen war eine deutliche Verlangsamung in der Entwicklung zu bemerken, bis nach 15—16 Wochen sich keine lebensfähigen Zellen mehr nachweisen ließen: die Nährlösung blieb völlig klar. Es ist indessen als sicher anzunehmen, daß beim Eintrocknen unter natürlichen Bedingungen die Keime noch bedeutend länger am Leben bleiben, sind sie doch an Heuproben von vorjährigen Ernten sowie an beliebig lange gelagertem Saatgut immer festzustellen. In dieser Hinsicht vollbringt also die vegetative Zelle des Pflanzenbewohners eine ähnliche Leistung wie die Spore bei anderen Bakterien.

Ferner verlangt das Leben auf der Pflanze eine gewisse Anspruchslosigkeit bezüglich der Nährstoffkonzentration. Wie Versuche mit den im Laboratorium gebräuchlichen flüssigen Nährmedien zeigen, vermag sich das Bact. herbicola zu vermehren, wenn reinem Wasser 0,01% Würze oder 0,1% Bouillon zugesetzt werden. Je geringer die Nährstoffkonzentration gewählt wird, um so geringer ist auch der O_2-Bedarf. Die Trübung der Nährflüssigkeit in der Röhrchenkultur zieht sich unter Ausbildung einer scharf abgegrenzten Wachstumszone immer weiter von der Oberfläche zurück.

Wo die Nährstoffe nur in geringer Konzentration zur Verfügung stehen, wie dies auf der Oberfläche der Pflanzen wohl im allgemeinen der Fall sein dürfte, ist die aktive Beweglichkeit für den Organismus, der auf einem solchen Substrat lebt, von großer Bedeutung. Das Vermögen des Schwärmens gestattet ihm, sich auf der ganzen Pflanzenoberfläche auszubreiten, vorausgesetzt, daß genügend Feuchtigkeit vorhanden ist. Die Bedeutung der Luftfeuchtigkeit für das Schwärmvermögen auf den Blättern ließ sich auf einfache Weise nachweisen. Gleichartige Keimlinge wurden unter gleichen Bedingungen aufgezogen, nur mit dem Unterschied, daß sich der eine Teil in gewöhnlicher Zimmerluft entwickelte, der andere dagegen unter einem Glassturz in feuchter Atmosphäre. Die Anwesenheit der Bakterien wurde auf den Blattspitzen durch Abdrücken derselben auf Zuckeragar nachgewiesen. Es zeigte sich dabei schon nach 1—2 Tagen ein deutlicher Unterschied, indem nämlich die Blattspitze des in feuchter Luft aufgewachsenen Pflänzchens längs seines Abdrucks eine starke Entwicklung von schleimig-glänzenden Kolonien hervorgerufen hatte, die dem Bact. herbicola angehörten, die des anderen dagegen nur einige wenige, von denen nur 3 oder 4 zum Bact. herbicola gehörten.

Schließlich sind auch die Temperaturgrenzen, innerhalb deren eine Entwicklung möglich ist, als wichtig anzuführen. Das Wachstumsoptimum liegt zwischen 20 und 30° C. Bei 37° ist die Vermehrung nur sehr gering. Eine Temperatur von 3° ermöglicht noch eine, wenn auch langsame Entwicklung; der Belag auf der Agarplatte ist dünn und trocken, Zooglöenbildung findet statt. Es werden demnach also die niederen Wärmegrade bevorzugt, wie dies den Standortbedingungen entspricht.

2. Die Begleitorganismen.

Unter dieser Bezeichnung sollen hier alle jene Mikroorganismen außer den Hefen und Schimmelpilzen verstanden werden, die ein so konstantes Element auf der grünen Pflanze bilden, daß sie nicht als zufällige Verunreinigungen anzusprechen sind. Neben dem Bact. herbicola kommen nach Düggeli in abnehmender Häufigkeit vor: Bact. fluorescens, Bact. putidum, Bac. megatherium, Bact. coli und Streptothrixarten. Bezüglich der beiden erstgenannten ist Düggeli

der Meinung, daß es sich bei ihnen, ebenso wie beim Bact. herbicola, um eine direkte Infektion des gesunden Samens von der Mutterpflanze aus handelt. Grapengeter teilt die häufigsten Epiphyten in vier große Gruppen ein:

1. Coli aerogenes - Gruppe.
2. Proteus - Gruppe.
3. Pseudomonas - Gruppe (Bact. fluorescens, Bact. punctatum, Bact. putidum).
4. Herbicola - Gruppe.

In anderen Arbeiten (Zikes, Hüttig, Hummer) finden sich Hinweise, aus denen ebenfalls hervorgeht, daß Fluorescens-putidum-Arten häufig und regelmäßig auf Pflanzenteilen gefunden werden. Eine abweichende Beobachtung wird dagegen von Wöller (35) mitgeteilt. An Pflanzen, die aus verschiedenen Gegenden Deutschlands stammten, wurde zwar stets dieselbe Bakterienflora vorgefunden, doch sollen überall Milchsäurebakterien vorherrschend gewesen sein.

Durch eine Reihe von statistischen Untersuchungen soll im folgenden eine Klärung dieser Fragen versucht werden:

1. Welche Organismen kommen regelmäßig gemeinsam mit dem Bact. herbicola auf der grünen Pflanze vor?

2. Welche praktische Bedeutung ist dieser Flora für die Milchwirtschaft zuzumessen?

3. Läßt sich auf Grund wesentlicher Merkmale eine Reihe von Charakteren angeben, die als typisch für pflanzenbewohnende Epiphyten zu gelten haben?

Um möglichst nur die eigentümliche Flora ohne allzuviel Zufallskeime zu erfassen, war darauf zu achten, daß stets lebendes Material von außerhalb der Stadt (Ausschaltung von Staub u. a.) zur Verwendung kam, daß mit Erde verunreinigte Blatteile vermieden wurden und daß die Probenahmen wiederholt und zu verschiedenen Zeiten stattfanden. Dabei erfuhren diejenigen Pflanzenarten, die als Weide- und Futterbestandteile eine Rolle spielen, wie Gras, Klee, Steckruben, eine besondere Beachtung; vergleichsweise gelangten daneben auch Proben einiger anderer Pflanzenarten zur Untersuchung.

a) Artzugehörigkeit und Eigenschaften.

Die Tabelle im Anhang gibt eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften von 23 Pflanzenstämmen, die unter Beachtung der obenerwähnten Gesichtspunkte in der Zeit zwischen Anfang September und Ende Oktober eingefangen wurden, und zwar handelt es sich bei diesen Stämmen immer nur um solche Bakterienarten, die ohne irgendwelche Anreicherungsverfahren auf den gewöhnlichen Nährböden zur Entwicklung kamen. Bei den folgenden Betrachtungen sind unter der Bezeichnung „Pflanzenstämme“ stets die auf Pflanzen gefundenen Bakterien ohne Bact. herbicola zu verstehen.

Die unter den Pflanzenstämmen angetroffenen Bakterienarten verteilen sich auf folgende systematische Gruppen:

Vertreter aus der Gruppe der verflussigenden Fluoreszenten	48%
Vertreter der nicht verflüssigenden Fluoreszenten (Putidumarten)	17%
Vertreter der farblosen Fluoreszenten	4%
Vertreter der Punctatum - Gruppe	13%
Vertreter der Coli - Gruppe	4%
Vertreter aus der Gruppe der Sporenbildner	4%
Nicht eindeutig bestimmte Arten	9%
	99%

Der einzige Vertreter der Coligruppe ist als ein „Pflanzencoli“ anzusehen: Milch- und Traubenzucker werden am stärksten vergoren bei Zimmertemperatur und 30°, bei 37° wird nur noch Traubenzucker vergoren, bei 45° findet überhaupt keine Gasbildung mehr statt. In Galle-laktose-gentianaviolett-Nährboden wird reichlich Gas gebildet, das Wachstum auf Endoagar ist typisch, Indolbildung fehlt jedoch. Die Zellen sind beweglich durch zwei polare Geißeln. Nach Ruschmann und Meyer wäre diese Form als Bact. coli anindolicum zu bezeichnen.

Als besonders häufig auftretende Merkmale dieser Bakterienstämme haben zu gelten:

Der Typ des beweglichen Kurzstäbchens	in	97%	der Fälle
Davon die gedrungene Coliform	„	17%	„ „
Die Farbstoffbildung	„	70%	„ „
Die Bildung von Schleim und Schleimverbänden	„	61%	„ „

Über die Art der Schleimbildung können einige genauere Angaben gemacht werden. Fünf Stämme der Fluorescens-putidum-Gruppe zeichneten sich durch die auffallende Anordnung ihrer Zellen in Form der sog. „Geldrollenlagerung“ aus, eine ganz analoge Erscheinung wie die Zooglöenbildung des Bact. herbicola, denn auch hier sind die Einzelzellen durch Schleimabsonderung zu größeren Verbänden zusammengetreten und zwar so, daß sie, mit ihren Längswänden nebeneinandergestellt, ganze Tafeln bilden. Von der Seite gesehen kommt dadurch das Bild der „Geldrolle“ zustande (Abb. 14), von oben gesehen ergibt sich eine Ansicht, die man als „Bienenwabenmuster“ ansprechen könnte. Diese Verbände bilden sich sehr schön im Federstrich, wenn nach einigen Tagen des Umherschwärmens die Bakterien allmählich zur Ruhe kommen.

Auf Agar zeigen die Fluorescens-putidum-Arten auch häufig schleimiges Wachstum. Oft geht dies aber nach einigen Übertragungen verloren.

Die Punctatumstämme erscheinen auf Agar in feuchten, glänzenden Kolonien, im Federstrich zeigen sie einen geringen Schleimabstand.

Stamm A, allerdings nur einmal beobachtet, macht flüssige Nährböden stark fadenziehend und bildet auf ihrer Oberfläche eine dicke, außerordentlich zähe Haut. Im Mikroskop zeigt er die Anordnung seiner Zellen in teilweise sehr langen Ketten, die gut beweglich sind. Stamm V, ebenfalls nur einmal festgestellt, aber wegen seiner Schleimbildung hier mit aufgezählt, ist ein Sporenbildner der Subtilisgruppe. Er zeigte auf der ersten Platte Kolonien, die unter einer oberflächlichen Haut schleimige Massen bargen. Nach einer weiteren Übertragung verschwand jedoch diese Erscheinung.

Unverkennbare äußere Ähnlichkeit mit dem Bact. herbicola zeigen vier der Pflanzenstämme und zwar diejenigen, die als „gelbe Putidumstämme“ bestimmt wurden. Ihr Verhalten gegenüber Kohlehydraten, Gelatine und Milch ist dem des Bact. herbicola ähnlich; dazu kommt die Farbstoffbildung und die Neigung zur Schleimbildung. Letztere ist bei Stamm D so ausgeprägt, daß er auf der Zuckeragarplatte von Bact. herbicola nicht zu unterscheiden ist. Ein Unterschied dagegen besteht hinsichtlich der Zellform (die Stäbchen sind viel länger und schlanker), hinsichtlich der Form der Schleimverbände (Geldrollen) und hinsichtlich der Begeißelung (der Stamm P weist eine polare Anordnung mehrerer Geißeln auf). Die Stämme U und D bilden in ganz geringem Maße fluoreszierenden Farbstoff.

b) Die auf Pflanzen vorkommenden Vertreter der Fluorescens-putidum-Gruppe.

Hüttig (14) stellte an einer großen Zahl von Stämmen Untersuchungen über fluoreszierende Bakterien aus der Molkerei, aus Wasser und Erde und von Pflanzen an. Dabei kam er zu der Feststellung, daß 20% der Stämme eine verzögerte Gelatineverflüssigung aufwiesen, Kasein nur schwach angriffen und auch die Fähigkeit der Fettspaltung nur in ganz geringem Maße zeigten. Dieselben Stämme waren gleichzeitig auch schwache Farbstoffbildner.

Diese von Hüttig für einen Teil der Fluoreszenten gegebene Beschreibung traf nun in denselben Punkten für die selbstisolierten Stämme zu: das Vorhandensein des fluoreszierenden Farbstoffes war häufig erst durch Zusatz einiger Tropfen Kalilauge deutlich zu machen; im Gelatinestich kam er überhaupt nicht zum Vorschein, in Bouillon und auf Milchagar nur sehr schwach, manchmal gar nicht in einem der beiden Medien. Der Abbau des Milcheiweißes sowie die Verflüssigung der Gelatine kam unter auffallender Verzögerung zustande; die Fettspaltung war nur in drei Fällen deutlich, in den anderen kaum oder gar nicht nachweisbar. In Peptonwasser wurden keine Geruchsstoffe gebildet; Diastasewirkung konnte nicht beobachtet werden. Auffallend war jedoch, die soeben aufgezählten Feststellungen für alle von Pflanzen isolierten Fluoreszenten in mehr oder weniger starkem Maße zutreffen zu sehen; es befand sich kein Stamm darunter, der die Eigenschaften dieser Gruppe in bekannter Weise gezeigt hätte. Interessanterweise gibt nun aber Hüttig gerade an, daß die auf Pflanzen als charakteristisch angetroffene Form sich ausgezeichnet durch eine reine, starke Fluorescens, durch starke Eiweiß- und Fettspaltung, durch Diastasegehalt und durch Schleimbildungsvermögen, während er über die Herkunft der von ihm beobachteten schwachen Stämme im einzelnen nichts aussagt. Die Hüttigschen Angaben über die Eigenschaften der Pflanzenfluoreszenten können also nur bezüglich der Schleimbildung bestätigt werden.

Eine gemeinsame Eigenschaft aller eigenen Fluorescens-putidum-Stämme besteht ferner darin, daß sie aus Traubenzucker Säure zu bilden vermögen, mit Ausnahme des Putidumstammes D. Hüttig gibt für seine Fluorescensstämme verschiedener Herkunft Säuerung von Traubenzucker in 15% der Fälle an, ohne jedoch die Pflanzenfluoreszenten einer gesonderten Betrachtung zu unterziehen.

Bei Hüttig findet sodann eine in Wasser, Erde und auf Pflanzen häufige Putidum-Abart Erwähnung, die sich von der Stammform äußerlich dadurch unterscheidet, daß sie auf Agar und Gelatine ockergelbe Auflagerungen bildet. Das Bakterium, als Bact. fluorescens aureum (Zimm.) bezeichnet, soll ein Drittel aller Putidum-Vertreter ausmachen. Diese Rasse soll nach Hüttig ganz besonders ausgeprägt die Tyrosinverfärbung zeigen und außerdem deutlich Stärke angreifen.

Von den eigenen gelben Putidumstämmen wies hingegen nur einer die Melaninbildung aus Tyrosin auf und Diastasewirkung keiner der vier Stämme.

Grapengeter schließlich führt an, daß die Pseudomonasgruppe unter allen Bakterien am häufigsten auf Pflanzen vertreten war, für einige Monate des Jahres stellt er sogar ein Überwiegen der Pseudomonas-Vertreter über die Herbicola-Gruppe fest.

c) Die Bedeutung der pflanzenbewohnenden Bakterien für die Milchwirtschaft.

Die neben dem Bact. herbicola an Weide- und Futterpflanzen angetroffenen Bakterien gehören zum größten Teil Gruppen an, die bekannt

sind als sog. „Alkalibildner". In einer Abhandlung über Alkalibildner, die aus normalen und fehlerhaften Milchproben isoliert wurden, nennt Henneberg (12, 1) unter anderen eine Reihe von Arten, die uns jetzt als Pflanzenbewohner bekannt geworden sind und zwar: Bact. fluorescens, Bact. putidum, Bact. trifolii, Verwandte des Bact. punctatum und Vertreter der Alkaligenes-Gruppe. Die eigenen Pflanzenstämme wurden nun sämtlich auf ihr Verhalten in Milch geprüft. Ein Abbau des Milcheiweißes fand statt bei 18 von 23 Stämmen und zwar waren dies Fluorescens- und Punctatum-Vertreter. Letztere zeichneten sich durch einen besonders schnellen und intensiven Abbau aus, während die Fluoreszenten, wie erwähnt, das Substrat nur verzögert angriffen. Die Alkalibildung konnte in Lackmusmilchröhrchen beobachtet werden: die Blaufärbung derselben begann, parallel mit dem Abbau, von oben her. Eine Alkalibildung ohne erkennbare Peptonisierung zeigten alle vier Putidumstämme. Die Punctatumstämme riefen außerdem frühzeitig bei Zimmertemperatur einsetzende Labgerinnung hervor. Die geschmacklichen Veränderungen der Milch wurden nach 2 tägigem Wachstum bei Zimmertemperatur geprüft: in 11 Fällen war nach dieser Zeit ein mehr oder weniger ausgeprägter bitterer Geschmack festzustellen, besonders intensiv wieder bei zwei Punctatumstämmen.

Aus diesen Angaben ist zu entnehmen, daß die pflanzenbewohnenden Mikroorganismen als Milchschädlinge sehr wohl in Frage kommen und daß bei genauer Kenntnis derselben die Ursache mancher Milchfehler aufgeklärt werden könnte.

d) Die gemeinsamen Merkmale der epiphytischen Pflanzenflora.

Unter Berücksichtigung der in der Literatur mitgeteilten Befunde sowie der eigenen Beobachtungen lassen sich bezüglich der Besiedlung der grünen Pflanzen mit Mikroorganismen folgende Feststellungen machen:

1. Abgesehen von den Schimmelpilzen, die nach Grapengeter den größten Teil sämtlicher pflanzenbewohnender Epiphyten ausmachen, läßt sich unter den Bakterien eine bestimmte Form als vorherrschend bezeichnen, nämlich die des beweglichen Kurzstäbchens. Andere Formen und bestimmte physiologische Gruppen wie Kokken, Sporenbildner, Milchsäurebakterien jedoch fallen auf durch ihr seltenes Vorkommen auf der lebenden grünen Pflanze. Außerdem wurden von Grapengeter fast immer, aber in nur sehr geringer Anzahl, Corynebakterien und Aktinomyceten gefunden.

2. Die häufigen Pflanzenbewohner zeigen außer der Zellform und der Beweglichkeit noch andere übereinstimmende Merkmale: die Zahl der farbstoffbildenden Stämme unter ihnen ist auffallend groß, vorherrschend scheint ein wasserunlösliches, gelbes Pigment zu sein, nämlich bei Bact. herbicola, Bact. putidum sowie bei einigen Angehörigen der Coligruppe (Ruschmann und Meyer). Irgendeine ökologische Bedeutung desselben ist aber nicht ohne weiteres ersichtlich. Indessen ist die häufige Erscheinung der Schleimbildung als eine spezifische Anpassung an die stark wechselnden Feuchtigkeitsverhältnisse auf der Pflanzenoberfläche anzusehen.

Zusammenfassend kann die Beantwortung der eingangs dieses Kapitels gestellten Fragen im folgenden gegeben werden: als ein typischer

Besiedler grüner Pflanzen kann das Bact. herbicola deswegen angesehen werden, weil sein Vorkommen auf diesen ein konstantes ist und weil andere natürliche Standorte desselben nicht bekannt sind. Seine Vermehrungstätigkeit ist an den Prozeß der Samenkeimung höherer, grüner Pflanzen gebunden und im Verein mit der aktiven Beweglichkeit und dem Schleimbildungsvermögen ausreichend, um die Erhaltung der Art zu sichern.

Neben dem Bact. herbicola kommen regelmäßig bestimmte andere Bakterienarten vor, und zwar handelt es sich in erster Linie um Fluorescens-putidum-punctatum-Arten.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit hat die Untersuchung des Bact. herbicola in allen wesentlichen Gesichtspunkten und dessen Stellung im System zum Gegenstand.

Es sind darin auf der Grundlage morphologisch-kultureller und physiologischer Ergebnisse folgende Feststellungen gemacht.:

1. Die selbstisolierten Stämme verschiedener Herkunft, die als Untersuchungsmaterial dienten, zeigen übereinstimmende Eigenschaften.

Stark bewegliche, zweigeißelige, gramnegative Kurzstäbchen mit großer Neigung zur Bildung von Schleim und charakteristischen, als „Zooglöen“ bezeichneten Wuchsverbänden, besonders auf zuckerhaltigen Nährböden.

Farbe der Kolonien auf allen Substraten leuchtend gelb, seltener farblos oder andersfarbig (rot-violett).

Langsame Gelatineverflüssigung, sehr geringer, äußerlich nicht wahrnehmbarer Abbau des Milcheiweißes, keine Ammoniak- und Schwefelwasserstoffbildung, keine Fettspaltung, keine Indolbildung.

Dicklegung der Milch durch Lab, optimal bei 37° C. Säurebildung aus Mono- und Disacchariden, aber nur ausnahmsweise aus Milchzucker, ferner aus einigen Pentosen. Die gebildete Säure ist vorzugsweise Milchsäure.

Gasbildung nur in sehr geringer, aber konstanter Menge aus Traubenzucker.

Nitrat wird reduziert, Katalase und Acetyl-methyl-carbinol werden gebildet.

Regelmäßiges Vorkommen auf grünen Pflanzen und ihren Teilen.

2. Auf Grund dieser Merkmale wird eine Identität der eigenen Stämme mit dem von Burri und Düggeli untersuchten und von ihnen als Pflanzenbewohner gekennzeichneten Bact. herbicola festgestellt.

Dagegen wird der von Hüttig als Bact. herbicola beschriebene Organismus wegen seiner abweichenden Eigenschaften als eine andere Bakterienart betrachtet.

3. Der Vergleich mit anderen gelbwachsenden Bakterienstämmen, vor allem mit der Gruppe der „Flavobakterien“ von Bergey, ergibt, daß das Bact. herbicola sich von allen dort aufgezählten Formen als verschieden erweist mit Ausnahme des Flavobact. trifolii.

4. Letzteres wird wegen der weitgehenden Übereinstimmung seiner Merkmale mit denen des Bact. herbicola mit diesem unter dem Namen: „Flavobact. herbicola Burri und Düggeli“ vereinigt und nicht als eine eigene Art betrachtet. Die Berechtigung dazu leitet sich her von den wesentlichen Unterschieden gegenüber den anderen Angehörigen der Gruppe „Flavobakterium“, gegenüber der Phytomonasgruppe und gegenüber der Coligruppe. Bezüglich der letzteren muß auch eine Auffassung des

Pflanzen-

Stamm	Fundort	Zellform	Traubenzucker		Milchzucker		Gel.-Verflüssigung	Abbau auf Milchagar	Milch		Peptonwasser, Geruch	Fettspaltung
			Säure	Gas	Säure	Gas			Lackmusmilch	Geschmack nach 2 Tagen		
A	Gras	Bewegliche Kurzstäbchen	—	—	—	—	+	+	Abbau	normal	—	+
B	Gras	Kurze Coliform, 2 Geißeln	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
C	Rübenblatt	Bewegliche coliartige Kurzstäbchen	+	+ $^2/_3$ CO_2 $^1/_3$ H_2	—	—	++	++	oben Abbau, unt. koagul.	stark bitter, etwas faulig	faulig	++
D	Gras	Bewegliche Kurzstäbchen	—	—	—	—	—	—	alkalisch ohne Abbau	normal	—	—
E	Gras	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	stark bitter	—	gering
F	Rübenblatt	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	normal	—	gering
G	Rübenblatt	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	schwach bitter	—	gering
H	Rübenblatt	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	schwach bitter	—	—
K	Löwenzahn, Blatt	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	leicht schleimg	—	+
L	Weißdorn, Blatt	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	—	—	alkalisch ohne Abbau	normal	—	—
M	Gras	Bewegl. Kurzst., polare Geißeln	+	—	—	—	+	+	Abbau	normal	—	—
N	Weißdorn, Beere	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	stark bitter	—	+
O	Gras	Bewegliche coliartige Kurzstäbchen	+	+ $^2/_3$ CO_2 $^1/_3$ H_2	—	—	++	++	oben Abbau, unt. koagul.	stark bitter	faulig	+
P	Pfaffenhütchen, Frucht	Bewegliche Kurzstäbchen, lophotrich	+	—	—	—	(+)	+	alkalisch, langs. Abbau	normal	—	—
R	Kastanie, Blatt	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	normal	—	+
S	Klee	Bewegliche Kurzstäbchen, 1 polare Geißel	+	—	—	—	+	+	Abbau	normal	—	—
T	Klee	Bewegliche schlanke Stäbchen	+	—	—	—	+	++	Abbau	bitter	—	gering
U	Gras	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	—	—	schwach alk., ohne Abbau	normal	—	—

tämme A—Z.

Reduktase	Stärkeabbau	Melaninbildung aus Tyrosin	Farbstoffbildung Art	Farbstoffbildung in Bouillon	Farbstoffbildung auf Milchagar	Schleimbildung Makroskopisch	Schleimbildung Mikroskopisch	Einordnung
—	—	—	—	—	—	Bouillon mit u. ohne Zuckerstark fadenziehend	Lange Stäbchenketten	unbestimmt
			—			—		Pflanzencoli
—	—	—	—			auf Agar schleimig-erhaben	geringer Schleimabstand im Federstrich	Punctatumart
—	—	—	gelb, wasserunlöslich	—	+	auf Agar dicke, zähschleimige Auflage	im Federstrich Geldrollenlagerung	gelbe Putidumart
—	—	—	grün, fluoreszierend	+	+	—	—	Fluorescensart
+	—	—	grün, fluoreszierend	+	—	—	im Federstrich Geldrollenlagerung	Fluorescensart
—	—	+	grün, fluoreszierend	+	+	—	im Federstrich Geldrollenlagerung	Fluorescensart
—	—	—	grün, fluoreszierend	(+)	—	—	—	Fluorescensart
+	—	—	grün, fluoreszierend	—	+	—	—	Fluorescensart
—	—	—	gelb, wasserunlöslich	—	+	auf Agar gleich nach dem Einfangen schleimig	im Federstrich Haufenbildung	gelbe Putidumart
—	—	—	dunkelgelb, wasserunlösl.	—	+	—	—	unbestimmt
+	—	—	grün, fluoreszierend	+	+	—	—	Fluorescensart
+	—	—	—			auf Agar feuchtschleimig	im Federstrich geringer Schleimabstand	Punctatumart
—	—	—	gelb, wasserunlöslich	—	+	auf Agar gleich nach dem Einfangen schleimig	—	gelbe Putidumart
+	—	—	grün, fluoreszierend	+	+	—	—	Fluorescensart
(+)	—	—	grün, fluoreszierend	+	—	—	im Federstrich Geldrollenlagerung	Fluorescensart
+	—	—	grün, fluoreszierend	—	+	Auf Traubenzuckeragar etwas schleimig	—	Fluorescensart
(+)	—	schw.	gelb, wasserunlöslich	—	+	auf Agar schleimig	im Federstrich Geldrollenlagerung	gelbe Putidumart

Pflanzen-

Stamm	Fundort	Zellform	Traubenzucker		Milchzucker		Gel. Verflüssigung	Abbau auf Milchagar	Milch		Peptonwasser, Geruch	Fettspaltung
			Säure	Gas	Säure	Gas			Lackmusmilch	Geschmack nach 2 Tagen		
V	Rübenblatt	—	—	—	—	—						
W	Gras	Bewegliche coliartige Kurzstäbchen	+	+ (wenig)	—	—	++	+	Abbau	normal	faulig	+
X	Gras	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	normal	—	—
Y	Rübenblatt	Bewegliche Kurzstäbchen	+	—	—	—	+	+	Abbau	bitter	—	—
Z	Gras	Bewegliche Kurzstäbchen, lophotrich	+	—	—	—	+	+	Abbau	schwach bitter	—	—

Bact. herbicola als eine Kreislaufform coliähnlicher Organismen abgelehnt werden, da die Umwandlungsversuche Hüttigs sich nicht bestätigen ließen.

5. Für die Untersuchung des kohlehydratspaltenden Fermentsystems kommt ein von den gebräuchlichen Methoden abweichendes Verfahren zur Anwendung. Sein Vorzug besteht vor allem darin, daß ein Fehlen jeglicher zusätzlichen organischen Verbindung einen Einsatz sämtlicher vorhandenen hydrolysierenden Enzyme von seiten des Bakteriums erfordert. Dadurch wird festgestellt, daß das Bact. herbicola eine größere Anzahl von Kohlehydraten zu säuern imstande ist, als sich vermittels der Chinablauagar- und der Hefewassermethode nachweisen läßt.

Sodann wird versucht, die dabei erhaltenen Resultate im Sinne der Weidenhagenschen Theorie über die „Spezifität der Carbohydrasen" zu deuten; doch kann diese Theorie nicht im erwünschten Maße bestätigt werden.

6. Als Milchschädling kann das Bact. herbicola nur bei Kühlhaltung der Milch eine Rolle spielen und zwar als Erreger eines bitteren Geschmacks, seltener wohl als Schleimbildner. Fälle von bitterer Milch, hervorgerufen durch Bact. trifolii, sind aus der Literatur bekannt. Bei höherer Temperatur macht sich indessen die Konkurrenz des Str. lactis in einer schnellen Unterdrückung des Keimes bemerkbar.

7. Das Bact. herbicola kann infolge Schleimproduktion und Beweglichkeit als besonders geeignet für das Leben auf der Pflanze angesehen werden. Eine stärkere Vermehrung findet nur während einer bestimmten Lebensperiode der Pflanze, nämlich der Samenkeimung, statt und ist auf dieses Stadium beschränkt. Auf den oberirdischen Teilen der Pflanze findet bei genügender Feuchtigkeit nur noch eine Ausbreitung statt, die eine Infektion von Früchten und Samen ermöglicht und damit das Übergehen auf eine neue Pflanzengeneration sicherstellt.

stämme A—Z.

Reduktase	Stärkeabbau	Melaninbildung aus Tyrosin	Farbstoffbildung			Schleimbildung		Einordnung
			Art	in Bouillon	auf Milchagar	Makroskopisch	Mikroskopisch	
						stark schleimig auf der ersten Platte	—	Sporenbildner der Subtilisgruppe
(+)	+	—	—			auf Agar feuchtschleimig	im Federstrich geringer Schleimabstand	Punctatumart
—	—	—	grun, fluoreszierend	—	schwach	—	—	Fluorescensart
—	—	—	grun, fluoreszierend	+	+	—	—	Fluorescensart
—	—	—	—			auf Traubenzuckeragar schleimig	—	farblose Fluorescensart

8. Bact. herbicola lebt auf der grünen Pflanze in Gemeinschaft mit einer Reihe von anderen Bakterien, die ebenfalls regelmäßige Bewohner derselben sind. Es handelt sich bei ihnen vor allem um Vertreter der Fluorescens-putidum-punctatum-Arten, die ebenfalls als Milchschädlinge in Frage kommen.

Die in dieser Arbeit untersuchten pflanzenbewohnenden Fluoreszenten fallen auf durch gehemmtes Angriffsvermögen für Fett und Eiweiß sowie durch schwache Farbstoffbildung. Allgemein kann bei ihnen die Entstehung von Säure aus Traubenzucker festgestellt werden.

Als häufig anzutreffende, gemeinsame Merkmale der Pflanzenbakterien werden die bewegliche Kurzstäbchenform, das Schleimbildungsvermögen und die Farbstoffproduktion genannt.

Literaturverzeichnis.

1. Barthel, Christian, Die Methoden zur Untersuchung von Milch- und Molkereiprodukten. Berlin 1920. — 2. Beijerinck, M. W. und Rant, A., Wundreiz, Parasitismus und Gummifluß bei den Amygdaleen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. 1906.) — 3. Bergey, Manual of Determinative Bacteriology. London 1934. — 4. Burri, Richard, Die Bakterienvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. 1903.) — 5. Chrzaszcz, T., Die Mikroorganismen der Gersten- und Malzkörner. (Wochenschr. f. Brauerei. Jahrg., 1902.) — 6. Düggeli, Max, Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflänzchen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12. 1904; Bd. 13. 1904.) — 7. Eisenberg, Philipp, Untersuchungen über die Variabilität der Bakterien. (Variabilität in der Typhus-Coli-Gruppe.) (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. Bd. 80. 1918.) — 8. Frank, B., Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. (Landw. Jahrb. Bd. 19. Berlin 1890.) — 9. Fuhrmann, Franz, Zur Kenntnis der Bakterienflora des Flaschenbieres. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 17. 1907.) — 10. Grapengeter, Arnd, Beitrag zur Kenntnis der epiphytischen Bakterienflora gesunder grüner Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung einiger für die Milchwirtschaft wichtiger Wiesenpflanzen. Dissertation. Kiel 1930. — 11. Gruber, Theodor, Die Bakterienflora von Runkelrüben, Steckrüben, Karotten, von Milch während der Stallfütterung und während des Weidegangs ein-

schließlich der in der Streu. Gras und Kot vorkommenden Mikroorganismen und deren Mengenverhaltnisse in den letzten 4 Medien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1902.) — 12. Henneberg, Wilhelm, 1. Zur Kenntnis der Alkalibildner in der Milch. (Milchwirtschaftl. Forsch. Bd. 12. 1931.) 2. Einfluß von Kochsalz auf das Wachstum und die Zellform bei Milchsaurebakterien, Bact. coli, Bact. aerogenes und einigen anderen wichtigen Milchbakterien. (Milchwirtschaftl. Forsch. Bd. 17. 1935.) — 13. Holliger, Wilhelm, Bakteriologische Untersuchungen uber Mehlteiggarung. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. 1902.) — 14. Huttig, Carl, 1. Der Streptococcus lactis (Lister) Lohnis, eine Form des Bact. herbicola B. et D. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931.) 2. Über die Entstehung von Milchsaurestreptokokken aus Bakterien der Coli-Gruppe. (Milchwirtschaftl. Forsch. Bd. 12. 1931.) 3. Neue Anschauungen uber die Entwicklungsmöglichkeiten bei Bakterien. (Molkereiztg. Hildesheim. Nr. 76. 1932.) 4. Die fluoreszierenden Bakterien in der Molkerei. (Milchwirtschaftl. Ztg. Stendal. Nr. 25. 34. Jahrg. S. 1085.) 5. Statistische Untersuchungen an Bakterien aus der Fluorescensgruppe. (Milchwirtschaftl. Forsch. Bd. 8. 1929.) 6. Untersuchungen an fluoreszierenden Bakterien aus Wasser, Erde und Pflanzen. (Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 47. Heft 6. 1929.) — 15. Hummer, Otto, Hefe im Konkurrenzkampf mit Mikroorganismen, welche auf dem Grünmalze vorkommen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 71. 1927.) — 16. Huß, H., Morphologisch-physiologische Studien uber zwei aromabildende Bakterien: Bac. esterificans Maassen und Pseudomonas trifolii nov. spec. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 19. 1907.) — 17. Janke-Zikes, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden und Leipzig 1928. — 18. Karstrom, Henning, Über die Enzymbildung in Bakterien. Helsinki 1930. — 19. Keipper, C. H., Fred, E. B., and Peterson, W. H., Microorganisms on Cabbage and Their Partial Removal by Water for the Making of Sauerkraut. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 86. 1932.) — 20. Klieneberger, E., Über die Brauchbarkeit unserer Zuchtungsverfahren für bakterielle Umwandlungsstudien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I, Orig. Bd. 126. 1932.) — 21. Kürsteiner, Richard, Die Bakterienflora von frischen und benutzten Streumaterialien mit besonderer Berücksichtigung ihrer Einwirkung auf Milch. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 47. 1917.) — 22. Lehmann-Neumann, Bakteriologische Diagnostik. Bd. II. München 1927. — 23. Levy, Fritz, Hygienische Untersuchungen über Mehl und Brot. (Arch. f. Hyg. Bd. 49. 1904.) — 24. Lindner, Paul, 1. Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Garungsgewerben. S. 603. Berlin 1930. 2. Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Garungskunde. Bd. I. 3. Aufl. Berlin 1927. — 25. Lohnis, F., Zur Morphologie und Biologie der Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 56. 1922.) — 26. Morgenthaler, Otto, Über die Mikroflora des normalen und muffigen Getreides. (Landwirtschaftl. Jahrb. d. Schweiz. Jahrg. 32. 1918.) — 27. Neuberg, C. und Simon, E., Über chemische Vorgänge und energetische Verhältnisse beim physiologischen Ab- und Umbau der Kohlehydrate. Ergebnisse der Enzymforschung. Bd. II. Leipzig 1933. — 28. Ohlmüller-Spitta, Untersuchung und Beurteilung des Wassers und Abwassers. 5. Aufl. Berlin 1931. S. 378. — 29. Rahn, Otto, Statistische Studien uber die Systeme der Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 46. 1916.) — 30. Ruschmann und Meyer, Die auf grünen Pflanzen vorkommenden Coli- und coliähnlichen Bakterien und ihre Eigenschaften unter verschiedenen Züchtungsbedingungen. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 5. 1934. 3. Heft.) — 31. Weidenhagen, Rudolf, Spezifität und Wirkungsmechanismus der Carbohydrasen. Ergebnisse der Enzymforschung. Bd. I. Leipzig 1932. — 32. Weigmann, H. und Wolff, A., Über die Flora der frischen und pasteurisierten Milch einer Viehherde bei Weidegang und Stallhaltung. (Forsch. a. d. Geb. d. Milchwirtschaft u. d. Molkereiwesens. 1921: Heft 2, 4, 6, 10, 11; 1922: Heft 1, 2, 3, 4.) — 33. Wigger, A., Untersuchungen über die Bakterienflora einiger Kraftfuttermittel in frischem und garendem Zustande, mit besonderer Berucksichtigung ihrer Einwirkung auf Milch. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 41. 1914.) — 34. Winkler, Willibald, Untersuchungen uber das Wesen der Bakterien und deren Einordnung in das Pilzsystem. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 5. 1899.) — 35. Wöller, H., Über die epiphytische Bakterienflora gesunder grüner Pflanzen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 79. 1929.) — 36. Wolff, A., Zur Frage nach den Beziehungen zwischen der Bakterienflora der Milch und der Weide. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 39. 1913/14.) — 37. Wright, J. H., On the Bacteria of the Schuylkill River. Memoirs of the National Academy of Science. Vol. 7. Washington 1895.) — 38. Zikes, Heinrich, Bakterienzooglöenbildung bei der Gerste. (Ber. d. Wiener Akad. Abt. I. Bd. 119. 1910.) — 39. Zimmermann, O. E. R., Die Bakterien unserer Trink- und Nutz-



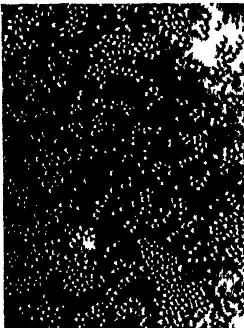
1



2



3



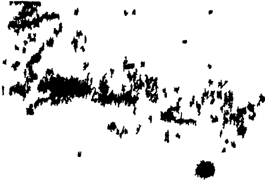
4



5



6



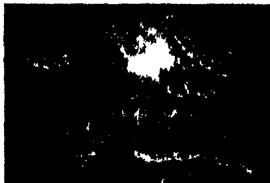
7



8



10

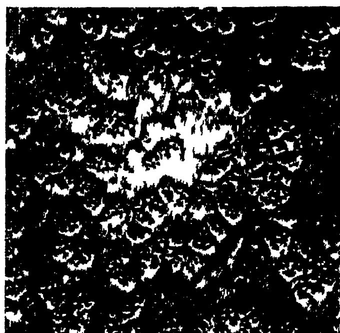


9

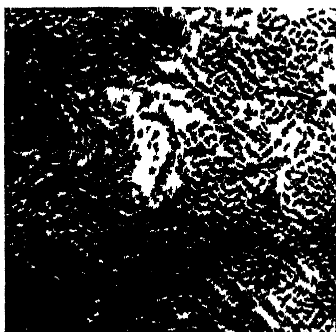
Verlag von Gustav Fischer in Jena



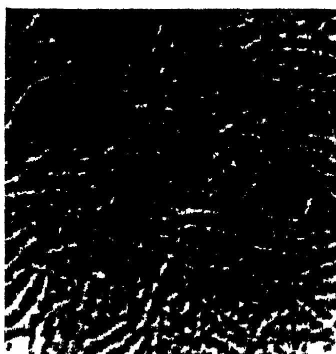
11



12



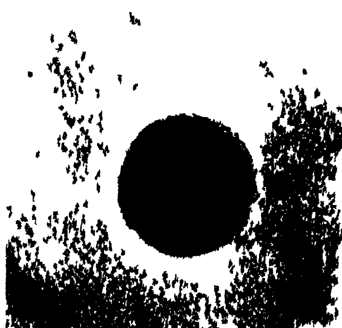
13



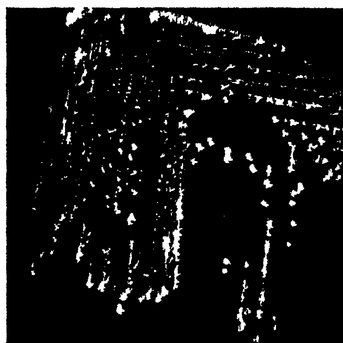
14



15



16



17

wässer, insbesondere der Chemnitzer Wasserleitung. (11. Ber. d. Naturw. Ges. zu Chemnitz. Chemnitz 1890.)

Tafelerklärung.

Tafel I.

Abb. 1. Bact. herb. B. et D. Normale Zellform.
Abb. 2. Bact. herb. B. et D. Involutionsformen (5% NaCl).
Abb. 3. Bact. herb. B. et D. Involutionsformen (7% NaCl).
Abb. 4. Bact. herb. A. Hüttig. Normale Zellform.
Abb. 5. Bact. herb. A. Hüttig. Streptokokken- und Tetradenlagerung (5% NaCl).
Abb. 6. Bact. herb. A. Hüttig. Blähformen (3% NaCl).
Abb. 7. Bact. herb. B. et D. Geißeln.
Abb. 8. Bact. herb. B. et D. Agardeckglaspräparat.
Abb. 9. Bact. herb. B. et D. Zooglöen im Federstrich.
Abb. 10. Bact. herb. B. et D. Schleimabstand im Würzefederstrich.

Tafel II.

Abb. 11. Bact. herb. B. et D. Zooglöenhaut in Maltosenährlösung.
Abb. 12. Bact. herb. B. et D. Teil einer Zooglöenhaut in Trz-Bouillon.
Abb. 13. Bact. herb. B. et D. Kettenbildung in fadenziehender Würze.
Abb. 14. Pflanzen-fluorescens: Geldrollenlagerung im Federstrich.
Abb. 15. Bact. herb. B. et D. Kolonien auf Bouillonagar.
Abb. 16. Bact. herb. B. et D. Schwärmkolonie auf Gelatine.
Abb. 17. Bact. herb. B. et D. Kultur auf Würzeagar.

Nachdruck verboten.

Die biologische Bearbeitung der Pflanzenreste.

IV. Über das Konservieren von Düngern.

Vorläufige Mitteilung.

[Aus dem Mikrobiologischen Laboratorium des Landwirtschaftlichen Instituts zu Leningrad.]

Von **I. A. Makrinow.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die zur Zeit üblichen Konservierungsmethoden von Düngern, wie z. B. die Methode von Krantz und das Verfahren der kalten Aufbewahrung, bestreben nach Möglichkeit die Mikroflora der Dünger einzuschränken und die bakteriellen Prozesse zu hemmen — dadurch wird einem eventuellen Verlust der Dünger an Kohlenwasserstoffen und Stickstoffverbindungen vorgebeugt.

Es können jedoch auch andere Konservierungsverfahren der Dünger angewandt werden, bei welchen im letzteren solche bakterielle Prozesse vor sich gehen, die bei geringem Verbrauch organischer Substanzen eine Steigerung des Stickstoffgehaltes durch die Lebenstätigkeit stickstofffixierender Bakterien herbeiführen. Die Bearbeitung der Dünger auf diese Weise soll zu einer üppigen Vermehrung der wertvollsten Bakteriengruppen — der aeroben Stickstoffbinder, welche gewöhnlich in Düngern fehlen, zur Verminderung des Verhältnisses des Kohlenstoffes zum Stickstoff und wenigstens zu einem teilweisen Zerfall schwer zersetzbarer Pflanzenreste führen.

Solch eine Bearbeitung der Dünger wurde in unseren Versuchen folgendermaßen durchgeführt: die Dünger wurden in lockeren Haufen aufgeschichtet und im Laufe von 5—6 Tagen bei gewöhnlicher Temperatur mit Wasser, welches 0,5—1,0% Kalk und ein aus aeroben stickstoff-fixierenden und zellulose-zersetzenden Bakterien bestehendes Infektionsmaterial enthielt, bearbeitet. Die Veränderungen der Mikroflora wurden durch mikroskopische Untersuchungen festgestellt, wobei folgende Erscheinungen wahrgenommen wurden: vor der Bearbeitung wiesen die Dünger eine überaus üppige und mannigfaltige Mikroflora auf, desgleichen auch am ersten Tage der Bearbeitung. Am zweiten und besonders am dritten Tage nahm die Anzahl der Mikroben bedeutend ab und sank zum Ende des vierten Tages dermaßen, daß im Gesichtsfelde des Mikroskopes nur noch einzelne, schwachgefärbte und ausgeprägt degenerierte Mikroben gefunden werden konnten.



Abb 1



Abb 2

Abb. 1. Gruppen von Azotobakterzellen in bearbeiteten Düngern.
Abb. 2. Bact. radicicola und andere Bakterien in bearbeiteten Düngern.

Daneben traten ovale Zellen eines gut färbbaren Mikroben und kleine Gruppen von Azotobakterzellen und Bact. radicicola auf. Am fünften Tage konnte man unter dem Mikroskop eine mannigfaltige, üppige und gut färbbare Mikroflora wahrnehmen — wobei die Azotobakter-, Bact. radicicola- und Zellulose-Bakteriengruppen immer größer wurden.

Diese Beobachtungen zeigen, daß die aerobe Bearbeitung der Dünger zum Ersatz der ursprünglichen Mikroflora durch eine andere, augenscheinlich, spezifische aerobe Mikroflora und zu einer üppigen Vermehrung der stickstoff-fixierenden Mikroben führt.

Nach dieser Bearbeitung erscheinen die Dünger dunkler gefärbt und gleichartiger und verlieren ihren Geruch — zu dieser Zeit erlangen die Anhäufungen der stickstoff-fixierenden Bakterien bedeutende Größe. Hier wurde die Bearbeitung der Dünger abgebrochen. Die Dünger wurden etwas getrocknet und einer eingehenden mikroskopischen, bakteriologischen und chemischen Untersuchung unterzogen.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte vor allem reiche Anhäufungen deutlich erkennbarer Azotobakter- (Abb. 1) und Bact. radicicola-Zellen (Abb. 2), bedeutend seltener Clostridium Pasteurianum-

Zellen, das Vorhandensein einer großen Anzahl von aeroben Zellulosebakterien und anderer Mikroben.

Die Aussaat auf Kieselplatten mit Mannit nach Winogradsky ergaben typische Azotobakterkolonien, von denen die Mehrzahl Gasblaschen bildeten. Die mikroskopischen Praparate aus solchen Kolonien zeigten die Anwesenheit von 3 Bakterienarten: Azotobakter, Bact. radicicola und Clostridium Pasteurianum (Abb. 3).



Abb. 3. Azotobakter + Bact radicicola + Clostridium Pasteurianum aus einer Kolonie einer Kieselplatte.

Die mikrobiologische Untersuchung der Dunger — eine Gruppenanalyse seiner Mikroflora, zeigte in den bearbeiteten Dungern folgende Mikrobenarten: ammonifizierende, Harnstoff hydrolysierende, nitrifizierende (beide Phasen), denitrifizierende, stickstoffbindende und Zellulosebakterien (aerobe und anaerobe).

In der Kontrolle — in unbearbeiteten Dungern, waren folgende Gruppen gefunden worden: ammonifizierende, Harnstoff hydrolysierende, aerobe und anaerobe Zellulosebakterien, die anderen Gruppen fehlten.

Die chemische Analyse betraf nur eine Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl der bearbeiteten und Kontrolldunger. Die Proben wurden aus grundlich verriebenem Material entnommen.

Fur jede Analyse wurden mehrere Proben genommen und die Mittelwerte bestimmt. Auf diese Weise wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Stickstoffgehalt der bearbeiteten Dunger	1,438%
2. Stickstoffgehalt der Kontrolldunger	1,388%
Differenz:	0,050%

Die Steigerung des Stickstoffgehaltes ist ganz unbedeutend, sie zeigt jedoch, daß wir nach unserer Bearbeitung Dunger mit nicht geringerem Stickstoffgehalt, als in den Kontrolldungern erhalten haben. Selbstverständlich bedeutet das nicht, daß während dem Bearbeitungsprozesse kein Stickstoffverlust stattgefunden hatte, zur genauen Berechnung der Stickstoffbalance in den bearbeiteten und Kontrolldüngern mußte man unbedingt noch den Verlust von organischen Substanzen im Zusammenhang mit dem Abnehmen oder der Steigerung des Stickstoffgehaltes feststellen. Man kann jedoch annehmen, daß infolge der kurzen Dauer der Bearbeitung — 6—7 Tage — und nachfolgender kompakter Einlagerung in die Behalter und der Aufbewahrung daselbst bei erschwertem Luftzutritt der Verlust an Stickstoff im allgemeinen gering sein sollte. Es ist möglich, daß bei unserer Bearbeitung ein Übergang der leicht fluchtigen Stickstoffverbindungen, z. B. NH_3 und solcher, welche bis zu freiem Stickstoff reduziert werden, z. B. Salpeter, in stabilere Verbindungen — Eiweiß der Bakterienzellen — stattfindet.

Die beschriebene Konservierungsmethode der Dünger besitzt eine Reihe

von Vorzügen und Eigentümlichkeiten, wie z. B. die kurze Dauer und äußere Unkompliziertheit des Verfahrens, welches im ganzen im Laufe von 6—7 Tagen vor sich geht, der Ersatz der größtenteils anaeroben Mikroflora der Dünger durch aerobe und das Auftreten der wichtigsten und wertvollsten Gruppen der Bodenmikroben, welche gewöhnlich in Düngern fehlen, z. B. der nitrifizierenden, aeroben stickstoffbindenden Bakterien. Der Verlust an Stickstoff bei der Aufbewahrung der bearbeiteten Dünger kann ganz unbedeutend sein. Der geringe Verlust an organischen Substanzen, welcher durch die Lebenstätigkeit der stickstoffbindenden Bakterien verursacht wird, führt zu einer — wenn auch unbedeutenden — Steigerung des Stickstoffgehaltes.

Schlußfolgerungen.

1. Bei der Bearbeitung der Dünger mit einem Gemisch aus stickstoffbindenden und zellulose-zersetzenden Bakterien unter aeroben Bedingungen findet eine üppige Vermehrung dieser Mikroben und der Ersatz des größten Teiles der anaeroben Mikroflora durch eine aerobe statt.
2. Nach der Bearbeitung erhält man Dünger, in denen der Stickstoffgehalt der gleiche ist wie vor der Bearbeitung.
3. Beim Aufbewahren der bearbeiteten Dünger in kompakten Haufen bei schwachem Luftzutritt muß der Verlust an Stickstoff scheinbar ganz unbedeutend sein und durch die Lebenstätigkeit der stickstoffbindenden Bakterien ersetzt werden, wobei der Verbrauch an organischen Substanzen gering ist.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen. Suppl.-Lief. 3 u. 4. Den Haag (Verlag W. Junk) 1936. Preis je 17 RM.

Lieferung 3 enthält im wesentlichen die Besprechung der Amylasen: Darstellung und Eigenschaften, Beeinflußbarkeit durch physikalische und chemische Faktoren, Vorkommen und Bedeutung für den Kohlehydrat-Haushalt. Sehr notwendig und erfreulich erscheinen Ref. die fast 50 Seiten umfassenden Abschnitte über das Substrat der Amylasen, über Chemie und Aufbau der Stärke und ihrer Hydrolysate. Es muß anerkannt werden, daß ein so groß angelegtes Werk wie der „Oppenheimer" bei der Darstellung dieses noch so sehr umstrittenen Gebietes völlige Neutralität wahrt, auch in solchen Fällen, wo nach der Meinung der beteiligten Forscher eine präzisere Stellungnahme heute schon möglich wäre.

In Lieferung 4 beginnt nach den Kapiteln „Nucleasen" und „Amidasen" (z. B. Arginase, Histidase und Urease) das große und schwierige Kapitel der „Proteasen". Entsprechend dem schon oben begrüßten Grundsatz, daß in einem Handbuche der Fermente die genaue Besprechung der Fermentsubstrate ebenso wichtig ist wie die der Fermentpräparate, werden auch hier einleitend auf bisher 30 Seiten Fragen des Aufbaues und Abbaues der Proteine sowie Nomenklaturfragen behandelt.

Es ist zu wünschen, daß dieses Handbuch von jedem benutzt wird, in dessen Denk- oder Arbeitskreis das Thema Fermente fällt.

E. Pfankuch (Berlin-Dahlem).

Allgemeines und Methodisches.

Hettche, H. O. und **Rosenthal, P.**, Vergleichende Untersuchungen über die bakterizide und entwicklungshemmende Wirkung von ätherischen Ölen. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 115. 1936. S. 303—317.)

Nelkenöl und Thymianöl wirken sowohl gegenüber grampositiven Kokken als auch gegenüber gramnegativen Stäbchen kräftig bakterizid. Die Öle töten Staphyl. aureus in der Konzentration 1 : 1000 ab, Bact. coli in der Konzentration 1 : 250.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Gottsacker, E., Über Trioform, ein neues Desinfektionsmittel. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 115. 1935. S. 198—204.)

„Trioform-Goldsiegel" leistet zwar gegenüber Coli nicht mehr als Sagrotan, zeigt aber gegenüber Kokken, Diphtherie-, Schottmüller- und Typhusbakterien eine z. T. beträchtliche Überlegenheit. Eine Sonderstellung unter den zur Prüfung verwendeten Testkeimen nahm ein zeitweise bröcklig wachsender Staphylokokkenstamm ein, mit dessen unfiltrierter Suspension ungleichmäßige Resultate erhalten wurden. Bei Verwendung des filtrierten Stammes wurde mehrfach mit der Trioformverdünnung 1 : 1000 eine stärkere Wirkung erzielt als mit der Verdünnung 1 : 100.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Iwanoff, K., Über die Wirkung des Formalins auf Antikörper. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 197—203.)

Unter dem Einfluß von Formalin werden die Antikörper von Immunseren mehr oder weniger stark geschädigt. Besonders empfindlich sind die Präzipitine. Antigene werden durch Formalin nicht beeinflußt, soweit es sich um die Eigenschaften handelt, Tiere aktiv zu präparieren oder in serologische Bakterien mit dem Antikörper zu treten.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Thiele, H., Ein Beitrag zum Nachweis gasbildender Keime. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 115. 1936. S. 257—259.)

Zur Ermittlung des Colititers in größeren Flüssigkeitsmengen, insbesondere in Wasser, wird an Stelle der unhandlichen Dunbar-Gärröhrchen die Verwendung von Jenaer Milchflaschen mit Durham-Röhrchen empfohlen. Die Gassammelröhrchen haben zweckmäßig einen Durchmesser von 2 cm und eine Länge von 12 cm. Sie besitzen dann ungefähr einen Rauminhalt von 30 ccm, das ist rund ein Achtel bis ein Viertel der Gesamtflüssigkeit, was sich als ausreichend erwiesen hat. Die sterilen Röhrchen werden mittels steriler Pinzette in die Flaschen gegeben, nachdem die zu untersuchende Flüssigkeit sowie Farbstoff- und Nährlösung eingefüllt wurden. Die Luft aus dem Gassammelröhrchen wird durch Umwenden der Flasche entfernt. Zu diesem Zwecke ist dem Wattestopfen ein Stanniolblatt unterzulegen, das mitsterilisiert wird und vor der Bebrütung der Flasche zu entfernen ist. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virus-Untersuchungen.

Meyer, K., Der Enterococcus als Artindividualität. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 204—211.)

Im Gegensatz zu Ehrismann kommt Verf. zu dem Ergebnis, daß

die Enterokokken einen besonderen, eindeutig definierbaren Streptokokkentyp darstellen, der sich in gleicher Weise aus der Familie der Streptokokken heraushebe wie z. B. der Strept. haemolyticus und der Strept. lanceolatus. Atypische Stämme, z. T. möglicherweise durch Bakteriophagenwirkung entstanden, sind nicht so häufig, daß sie die praktische Bedeutung des Enterokokkus in Frage stellen könnten; dies um so weniger, als Krankheitsprozesse ganz überwiegend durch typische Stämme bedingt sind.

Es ist eine Unmöglichkeit, die Enterokokken mit „den" Milchsäurestreptokokken identifizieren zu wollen, da diese eine Vielheit von Typen darstellen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Takeda, K., Immunisatorische Einteilung der Enterokokken. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 86. 1935. S. 341—346.)

96 aus Darminhalt gezüchtete, mikroskopisch und biologisch typische Enterokokken konnten agglutino-absorptorisch in 18 Typen aufgeteilt werden, die durch ihre unspezifischen Rezeptoren untereinander nahe verwandt, andererseits durch ihre spezifischen Rezeptoren ganz verschieden voneinander waren. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Takeda, K., Immunisatorische Untersuchung von Milchstreptokokken. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 86. 1935. S. 347—349.)

Die an 13 Milchstreptokokken-Stämmen durchgeführte Untersuchung lieferte 2 immunisatorisch verschiedene Typen mit spezifischen und unspezifischen Rezeptoren. Die unspezifischen Rezeptoren deuteten auf eine mehr oder weniger nahe Verwandtschaft mit den Mundstreptokokken einerseits und den Enterokokken andererseits, von denen sie sich jedoch durch ihre spezifischen Rezeptoren grundlegend unterschieden. Es bestanden keine Beziehungen zwischen den Milchstreptokokken (dasselbe gilt für die Mundstreptokokken und Enterokokken) und Strept. viridans, lanceolatus und haemolyticus.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Grunske, F. und Unger, A., Untersuchungen über das sog. Bact. typhi flavum. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 115. 1935. S. 177—180.)

Trotz 230 Überimpfungen zeigte sich niemals Umwandlung von Gelbkeimen in Typhusbakterien. Bei Abspaltungen hat es sich um unwesentliche Variationen gehandelt, wie sie bei anderen Bakterien schon bekannt sind.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Heiduschka, G., Untersuchungen über die Dampfresistenz der Gasbrandsporen. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 115. 1935. S. 54—60.)

Gasbrandsporen von maximaler Dampfresistenz bilden sich in Leberbouillon mit Kreidezusatz und in alkalischem Hirnbrei. Bei 4 untersuchten Stämmen betrug die maximale Dampfresistenz 16, 21, 23 und 29 Min. Danach sind die Fraenkelschen Gasbrandsporen nicht widerstandsfähiger gegen strömenden Wasserdampf als Milzbrand-, Rauschbrand- und Tetanussporen.

Als optimale Nachkulturnährböden für geschädigte Gasbrandsporen erwiesen sich Leberbouillon und alkalischer Hirnbrei.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Kliewe, H. und Hsü, M., Studien über Friedländerbazillen und andere Kapselbakterien. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 86. 1935. S. 481—499.)

An Hand einer größeren Anzahl von Friedländer-, Ozaena-, Rhinosklerom- und Aerogenesbakterien sowie aus dem Rachen von gesunden Kindern gezüchteten anderen Schleimbildnern wurde eine Gruppen-, Art- und Typeneinteilung der Kapselbakterien versucht. Nach dem biochemischen Verhalten lassen sich 2 Hauptgruppen unterscheiden: die Friedländer-Aerogenes- und die Sklerom-Ozaenabakteriengruppe. Eine orientierende Trennung nach Arten ist mit Hilfe der Zuckerarten Laktose, Saccharose und Dextrin möglich. Zur einwandfreien Artbestimmung gehören weiterhin die Voges-Proskauer-, Methylrot-, Lackmusreduktionsprobe, das Verhalten in frischer Galle und in Milch sowie die Prüfung auf Gasbildungsvermögen in Neutralrotagar.

Einzelne Arten ließen sich mit Hilfe der Agglutinationsreaktion trennen (gelegentliche Mitagglutinationen blieben hinter den Hauptagglutinationen meist weit zurück). Auch die Präzipitin-, Thermopräzipitin- und Komplementbindungsreaktion lieferten bei gewissen Arten streng spezifische Ergebnisse.

Neben den bekannten Gruppen und Arten wurden Kapselbakterien beobachtet, die biochemisch, serologisch oder pathogenetisch besondere Arten oder Typen vorstellten.

Bakterien aus der Friedländer-Aerogenesgruppe wirkten sehr stark antagonistisch gegenüber den verschiedensten Bakterienarten, Ozaenabakterien nur gegenüber Sklerombakterien; Sklerombakterien entwickelten überhaupt keinen Antagonismus. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Aoki, M., Agglutinatorische Untersuchung von Aktinomyzeten. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 86. 1935. S. 518—524.)

Bei Aktinomyzeten ist Agglutination ebenso gut ausführbar wie bei anderen Bakterien. Die geprüften anaeroben Stämme verhielten sich agglutinatorisch sämtlich gleich, die aeroben Stämme ließen sich in 5 Gruppen mit eigenen spezifischen Rezeptoren trennen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Lohmann, K., Über die Aldolase, ein kohlenstoffbindendes Ferment. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 327—328.)

Unter der Einwirkung der Aldolase zerfällt in wässerigen Extrakten aus tierischem Gewebe, Hefe, Pflanzen Hexosediphosphat reversibel in Triosephosphorsäuren. Die fermentative Aldolkondensation von Dioxyazetonphosphorsäure erfolgt auch mit zahlreichen anderen Aldehyden, wofür Beispiele angeführt werden. Die entstehenden Ketophosphorsäuren (aus inaktiven Komponenten) sind sämtlich optisch aktiv. Die Aldolase greift dabei mit zwei Haftstellen an und zwar mit der ersten an dem gesamten Molekül der Dioxyazetonphosphorsäure, mit der zweiten nur an der Aldehydgruppe, während der übrige Aldehydrest anscheinend nur die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflußt. Durch enzymatische Abspaltung der Phosphorsäure kann man die nicht phosphorylierten Verbindungen erhalten. Heuß (Berlin).

Güller, W., Verhalten verschiedener Bakteriophagen gegenüber chemischen und physikalischen Einwirkungen. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 86. 1935. S. 248—259.)

Die Untersuchung dreier Staphylokokkenbakteriophagen, eines Typhus- und eines Ruhrphagen gegenüber Erhitzung und dem Einfluß verschiedener Desinfektionsmittel machte z. T. außerordentlich große Unterschiede im Verhalten der einzelnen Phagen offenbar: Während gewisse Bakteriophagen gegen stark wirksame Desinfektionsmittel (Sagrotan) ziemlich unempfindlich sind (so daß zu ihrer Inaktivierung sehr hohe Konzentrationen des Desinfiziens erforderlich sind), werden andere Phagen bereits von verhältnismäßig schwach wirksamen Desinfektionsmitteln (Kresolseife) stark beeinflußt. Die Staphylokokkenbakteriophagen waren gegenüber Erhitzung und Desinfektionsmitteln bedeutend empfindlicher als die gegen gramnegative Stäbchen wirksamen Phagen. Bei der Gewinnung der Staphylokokkenbakteriophagen muß also die Erhitzung der phagenhaltigen Bouillon zwecks Abtötung der Bakterien unterbleiben. Beim Arbeiten mit Staphylokokkenbakteriophagen kann, im Gegensatz zu den hitzeresistenten Coli-, Typhus-, Paratyphus- und Ruhrbakteriophagen die Filtrierung nicht entbehrt werden.

Die Ergebnisse sprechen gegen die Annahme der belebten Natur der Bakteriophagen und beweisen die Vielheit der Bakteriophagen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Oesterle, P., Farbstoffschwund durch Phagwirkung. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 86. 1935. S. 232—234.)

Aus dem gegenüber Coliphagen lysosensiblen Bact. coli flavum wurde durch Phagwirkung eine Blaßform als phagresistente Variante erhalten. Rückzüchtung in die gelbe phagempfindliche Form gelang nicht (30 Generationen in 2 Monaten). Durch Züchtung in Rindergalle entstand aus phagfreien Kulturen ebenfalls eine phagresistente Blaßform.

Sog. Gelbkeimphagen wirkten nicht auf Bact. coli flavum.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Silva-Mello, A. da, Frischerhaltung der Milch nach dem Hofius-Verfahren. (Med. Klinik. Jahrg. 32. 1936. S. 586—587.)

Die nach dem Hofius-Verfahren konservierte Milch entspricht keineswegs mehr der Frischmilch, da es durch die Anwendung des hohen Sauerstoffüberdruckes zum mindesten zur Zerstörung der antiskorbutischen Vitamine kommt. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Phelan, J. F., Some effects of the proposed new bacteriological techniques. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 385—394.)

Verf. befaßt sich mit den in der letzten Zeit gemachten Vorschlägen, anstatt der jetzigen Standardvorschriften bei der Keimbestimmung von Milch nach dem Plattenverfahren Trypton-Glukose-Magermilchagar bei einer Temperatur von 32° C zu verwenden. Er stellte an Hand von 1962 Proben verschiedener Art (Milch, Rahm, Eiscreme, Schwenkwasser aus Milchflaschen und Milchkannen) folgende Vergleiche an: a) Standardagar und Trypton-Glukose-Magermilchagar bei 37° C; b) Standardagar bei 37° und 32° C; c) Standardagar bei 37° C und Trypton-Glukose-Magermilchagar bei 32° C. Alle Platten wurden 2 Tage bebrütet. Was die unter a) genannten Versuche betrifft, so entwickelte sich auf den Trypton-Agarplatten

durchweg ein höherer Prozentsatz von Kolonien als auf den Standard-Agarplatten, wobei die Vorzugsmilch nur einen 20proz. Zuwachs und die Grad A-Milch nur einen 24proz. Zuwachs zeigte, während die Grad B-Milch (pasteurisiert) einen 200proz. Zuwachs aufwies (der Trypton-Agar ist also ein guter Nährboden fur die in pasteurisierter Milch wachsenden Bakterien!). Die Analyse der unter b) genannten Versuche ergab hinsichtlich Zunahme an Kolonien auf den bei 32° C bebrüteten Standardagar-Platten im Vergleich zu den bei 37° C bebruteten ungefähr dasselbe Verhältnis, das die bei 37° C bebruteten Tryptonagar-Platten im Vergleich zu den bei 37° bebrüteten Standardagar-Platten gezeigt hatten. Wesentlichere Unterschiede wurden jedoch beim Vergleich der nach c) durchgefuhrten Versuche gefunden. Immerhin blieb auch hier der Unterschied bei der Vorzugsmilch gering, während alle anderen Milchtypen eine beängstigende Zunahme der Kolonienzahlen auf Tryptonagar bei 32° C im Vergleich zum Standardagar bei 37° C aufwiesen. So ergab sich z. B. bei Grad A-Milch ein Zuwachs von 288%, bei Grad B-Milch ein solcher von 476% und bei in Flaschen abgefülltem Rahm ein Zuwachs von 630%. Es stimmt zwar, daß die Einführung des neuen Agars die Produzenten von erstklassiger Milch weiter nicht berühren würde, aber schon bei Grad B-Milch sind die Keimzahlsteigerungen nach der neuen Methode so stark, daß die Lieferanten dieser Milch durch Annahme der neuen Forderung in ganz schwierige Situationen kommen würden. Nach Verff. sollte man mit der Einführung der neuen Vorschläge noch warten, bis sich herausstellt, ob sich die gesamte Milchindustrie den neuen Forderungen auch wirklich anpassen kann. Abgesehen von den großen Verlusten für die Milcherzeuger würde sich daraus auch eine Erschütterung des Vertrauens ergeben, das der Verbraucher bis jetzt bezüglich der Qualität der Milcherzeugung hatte.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Bowers, C. S., and Hucker, G. J., Further studies of the composition of media for the bacteriological analysis of milk. (Am. Journ. of Public Health. Vol. 26. 1936. p. 350—352.)

Bei der Untersuchung von 114 Roh- und 173 pasteurisierten Milchproben konnte gezeigt werden, daß die Zufügung von Magermilch zum Standard-Nähragar das Ergebnis der Kolonienzählung um 17%, die Zufügung von Glukose jedoch um 35% erhöhte. Die Platten wurden 2 Tage bei 37° C bebrütet. Mit dem von den Autoren schon früher beschriebenen Tryptonagar mit verschiedenen Zusätzen wurden im Vergleich zum Standardagar weitere 204 Rohmilch- und 240 pasteurisierte Milchproben untersucht. Es stellte sich heraus, daß der Trypton-Glukose-Agar das Ergebnis der Kolonienzählung im Vergleich zum Standardagar bei Rohmilch um 34% und bei pasteurisierter Milch um 47% erhöhte. Betreffs des Zusatzes von Magermilch zum Trypton-Glukose-Agar war die Frage zu klären, ob die damit verbundenen Vorteile nicht durch die Nachteile (Schwierigkeit, immer frische Magermilch zur Verfügung zu haben, Auftreten von feinen Trübungen) wieder wett gemacht würden. Das Ergebnis war, daß bei beiden Milchsorten die Zufügung von Frischmilch zum Tryptonagar das Endergebnis der Kolonienzählung nicht wesentlich verbesserte. Schließlich wurde ein neues Peptonpräparat untersucht, namens Neopepton. Neopepton-Glukose-Agar wurde nun mit dem Trypton-Glukose-Agar verglichen. Für diese Zwecke wurden 420 pasteurisierte Milchproben ausgewählt. Es zeigte sich, daß mit dem Trypton-Glukose-Agar um 37% höhere Kolonienzahlen erhalten wurden als mit dem Neopepton-Medium. Daraus geht hervor, daß das Tryptonpräparat dem Neopeptonpräparat vorzuziehen ist. Insgesamt kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Zufügung von Magermilch oder Glukose zum Standardagar diesen noch lange nicht zu einem so guten Nährmedium macht, als es der Trypton-Glukose-Agar oder der Trypton-Glukose-Magermilchagar ist.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

McCrady, H. M., and **Archambault, J. C. E.**, Discussion. (Am. Journ. of Public Health. Vol. 26. 1936. p. 353.)

Die Diskussionsredner berichten zum vorhergehend referierten Artikel über eigene vergleichende Versuche mit Standard-Agar, Standard-Magermilchagar und Trypton-Glukose-Magermilchagar an Hand von 40 Rohmilch- und 45 pasteurisierten Milchproben. Sie fanden, daß der gewohnliche Standard- und der Trypton-Magermilchagar betreffs Resultat der Kolonienzählung in gleicher Weise brauchbar sind, dagegen verursachte die Zufügung von Magermilch zum Standard-Agar eine Trübung, die für das genaue Zählen unerwünscht ist. Besondere Beachtung wurde der Variation der Keimzahlergebnisse bei den rohen und pasteurisierten Milchproben geschenkt. Unterschiede von mehr als 200% im Vergleich zu den jeweils erhaltenen niedrigsten Keimzahlwerten wurden weit häufiger bei den pasteurisierten als bei den Rohmilchproben beobachtet. K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Nielsen, N., Untersuchungen über die Fähigkeit der Hefe, koagulierbaren Stickstoff auszuscheiden. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 113—116.)

Es ist möglich, den gesamten koagulierbaren Stickstoff aus der Würze zu entfernen, wenn man sie im voraus längere Zeit auf eine Temperatur erhitzt, die erheblich über der zur Bestimmung des koagulierbaren Stickstoffs notwendigen liegt. Bei halbstündiger Erhitzung auf 125° C läßt sich nach der Filtration kein koagulierbarer Stickstoff mehr nachweisen. In einer so behandelten Würze scheidet Hefe keinen koagulierbaren Stickstoff mehr aus, weder während des Wachstums noch während der Autolyse. Auch in einer synthetischen Nährlösung scheidet Hefe keinen koagulierbaren Stickstoff aus. Bei allen Versuchen wurde aber eine kräftige Stickstoffausscheidung festgestellt, der ausgeschiedene Stickstoff muß aber aus nicht koagulierbaren Verbindungen bestehen.

Bestimmungen, die während der Gärung und Lagerung in den Carlsberg-Brauereien durchgeführt wurden, zeigten keine Ausscheidungen von koagulierbarem Stickstoff aus der Hefe. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß eine Ausscheidung von koagulierbarem Stickstoff normalerweise nicht stattfindet, sondern nur unter besonderen Bedingungen. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F., Hoch- und niedrigvergärende Hefen. a) Ausbeuteversuche in der Praxis. b) Laboratoriumsversuche über Vermehrung von Hefe in Schlauchbier. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 34. 1936. S. 358.)

Ausbeuteversuche über Bottich- und Gelägerhefe im praktischen Betrieb zeigten, daß bei einer hochvergärenden Rasse im Bottich, auf Trockensubstanz berechnet, wesentlich weniger Ausbeute vorhanden war, als bei einer niedrigvergärenden Hefe. Dafur war die Ernte an Geläger bei der hochvergärenden Hefe höher. Außerdem fand man, daß die Summe von Bodensatzhefe im Bottich und Hefenzentrifugat beim Schlauchen ebenso groß war wie die Summe von Bodensatzhefe + Gelägerhefe am Schluß der Nachgärung. Die gesamte Hefenmenge, auch für die Nachgärung, ist also schon im Gärbottich erzeugt und wird nicht etwa durch neues Wachstum später neugebildet.

Diese Ergebnisse decken sich mit Laboratoriumsversuchen, bei denen schlauchreifes Bottichbier keine Hefenvermehrung mehr zeigte. Eine Neubildung von Zellen tritt also unter normalen Verhältnissen nach der Hauptgärung nicht mehr auf. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F. und **Koch, K.**, Die Bestimmung der vermehrungsfähigen Zellen in Bierhefe. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 34. 1936. S 358.)

Bei der Untersuchung von Bierhefe, die frisch aus der Wanne entnommen war, auf vermehrungsfähige Zellen fand man nur einen Prozentsatz von 50—60%. Im Bottich nach dem Anstellen und beim Umdrücken erwiesen sich 100% der Zellen als vermehrungsfähig. Die scheinbar nicht vermehrungsfähigen Zellen haben sich also nach kurzem Verweilen in Würze vollständig erholt. Nach dieser Erholung sinkt dann die Vermehrungsfähigkeit der Zellen im Verlauf der Haupt- und Nachgärung fortwährend ab.

Heuß (Berlin).

Schoberth, H., Gärgeschwindigkeit — Hefeaufbewahrung. (Allg. Anzeig. f. Brauereien, Mälzereien und Hopfenbau. Bd. 52. 1936. S. 217—218.)

Die höchste Gärgeschwindigkeit besitzt frisch geerntete Bottichhefe. An zweiter Stelle folgt Hefe, die unter 10 proz. Rohrzuckerlösung gelagert wurde, an dritter Stelle gepreßte Hefe, am spätesten setzt die Gärung ein bei Hefe, die mehrere Tage unter Wasser aufbewahrt wurde. Die Schwächung der Gärgeschwindigkeit ist in diesem Fall nur gering, erheblich ist sie, wenn die Hefe statt unter Wasser unter Bier gelagert wird. Heuß (Berlin).

Wrede, F., Trockenhefe. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 34. 1936. S. 326.)

Gewöhnliche Trockenhefe stellt man her, indem man Brauereiabfallhefe auf Walzentrocknern auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 10—12% heruntertrocknet. Man erhält dabei ein ausgezeichnetes, protein- und vitaminreiches Futtermittel. Wenn die Bierhefe gereinigt und entbittert ist, wird sie als „Nährhefe“ der menschlichen Nahrung zugesetzt. Trockenhefe mit zymatischer Wirkung stellt man auf Vakuumtrocknern her, dabei darf die Trocknungstemperatur 40° C nicht übersteigen. Im Vakuum platzen die Hefezellen und verlieren ihr Sprossungsvermögen. Will man „virulente“ Trockenhefe herstellen, die neben der Gärkraft auch noch Vermehrungsfähigkeit besitzt, so muß man die Hefe entweder durch Zerstäubung oder auf einem Bandtrockner sehr schonend bei einer Temperatur von 25—30° C trocknen. Es entsteht eine Dauertrockenhefe, die haltbar und exportfähig ist.

Heuß (Berlin).

Scholler, H., Die Gewinnung von Zucker, Spiritus und Futterhefe aus Holz als Rohstoff. (Chemiker-Zeitg. Bd. 60. 1936. S. 293—296.)

Der Hauptbestandteil der verholzten Pflanze, die Cellulose, wird von der Natur aus Zucker aufgebaut. Bei der Einwirkung von Säure wird die Cellulose wieder in ihre Bausteine, die Zuckermoleküle, zerlegt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Cellulose- oder Holzverzuckerung. An technischen Verfahren sind in letzter Zeit bekannt geworden: das Stettiner Kriegsverfahren, das aber an mangelhaften Ausbeuten krankte, das Bergius-Rheinau-Verfahren und das Scholler-Tornesch-Verfahren. Alle drei Verfahren werden kurz beschrieben. Ihre wirtschaftliche Grundlage ist zunächst noch die Herstellung von Spiritus. Noch wichtiger als die Herstellung von Treibstoffspiritus erscheint aber die Gewinnung von Eiweißfuttermitteln aus Holzzucker, weil die deutsche Landwirtschaft den Bedarf daran nicht vollständig decken kann. Die Lösung des Eiweißproblems wird auf drei grundsätzlich verschiedenen Wegen versucht: durch Steigerung

der landwirtschaftlichen Erzeugung, durch Verfütterung chemischer Produkte und durch Massenzüchtung von Mikroorganismen. Diese biologische Eiweißsynthese ist unabhängig von der Anbaufläche und erzeugt natürliches Eiweiß in hochwertiger Form.

Die verdünnte Holzzuckerlösung wird mit den zur Hefezucht nötigen Nährstoffen versetzt, nachdem der Zucker von der unter Luftung gezüchteten Hefe verzehrt ist, wird diese von der Lösung getrennt. Die Ernte an Trockenhefe aus 100 kg Holztrockensubstanz bzw. 50 kg Holzzucker beträgt 25 kg.

Heuß (Berlin).

Plewako, E. A. und Zechomskaja, W., Die Verwertung des Zuckers der Stroh- und Maiskolbenspindelhydrolysaten durch die Anwendung neuer Hefestämme. (Aus den Arbeiten der Mikrobiologischen Abteilung des Zentralen Forschungslaboratoriums für Gärindustrie.) Fortschritte der Zootechnischen Wissenschaften. Bd. 1. Folge 1. 1935. S. 37—43.) [Russ.]

Die Hefepilze Monilia murmanica und Oidium laminaricum besitzen die Fähigkeit, die Pentosen des Strohes und der Maiskolbenspindel gut zu verwerten, so daß sie zur Herstellung der Futterhefe, die bekanntlich sehr günstige Wirkung auf die Entwicklung des Jungviehes ausübt, benutzt werden können. Als Stickstoff- und Phosphorsäurequelle verwerten die Pilze Ammoniak bzw. Superphosphat. Bei den Versuchen wurde aus 300 g Stroh 14 200 ccm Hydrolysat mit einem Zuckergehalt von 142 g gewonnen. Die Hefemenge betrug 284,1 g bei einem Stickstoffgehalt von 2,28%. M. Gordienko (Berlin).

Garder, L., Makarowa, M., Borowkowa. u. a., Futtersilieren mit Säureanwendung. [Aus den Arbeiten des Instituts für landwirtschaftl. Mikrobiologie.] (Probleme der Tierzucht. Bd. 8. 1935. S. 43—54.) [Russ.]

Man stellte Versuche mit Silieren des Klees, der Luzerne u. a. stickstoffreichen Pflanzen in Gruben unter Zubringung von reiner Milchsäurebakterienkultur an, deren Ergebnisse folgenderweise kurz gefaßt werden können: Das Silieren stickstoffreicher Pflanzen unter Zubringung der Milchsäurebakterien ergab günstige Resultate; es wurde dadurch die Silagequalität bedeutend verbessert, die Aufbewahrungsfähigkeit erhöht und der Verlust an Nährstoffen vermindert. Nach 4 monat. Silieren des Klees (vom 2. Schnitt) mit und ohne Zugabe von Milchsäurebakterienkultur ergab die chemische Analyse folgenden Gehalt an Säuren (in %): Wasser, in Proben mit Milchsäurebakterienkultur — 62,55, in Proben ohne diese — 64,41, Milchsäure — 1,32 bzw. 0,37, freie Essigsäure — 0,20 bzw. 0,23, Buttersäure — 0 bzw. 0, p_H-Zahl — 4,30 bzw. 4,70. Auch nach 8 monat. Aufbewahrung wies Kleesilage mit Milchsäurebakterienkultur noch vollkommen gute Beschaffenheit auf, während diejenige ohne Milchsäurebakterienkultur nur sehr mäßige Qualität besaß (schon geringer Gehalt an Buttersäure usw.).

M. Gordienko (Berlin).

Druckfehlerberichtigung.

In der Arbeit Demeter und Pfundt „Über das Verhalten einiger molkereitechnisch wichtiger Penicillium-Arten gegenüber verschiedenen organischen Stickstoffquellen" in diesem Band muß es auf Seite 62, Zeile 16 von oben heißen: „kein Anhaltspunkt" anstatt „ein Anhaltspunkt".

Abgeschlossen am 7. Oktober 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 95. No. 13/17.
Ausgegeben am 4. Dezember 1936.

Nachdruck verboten.

Der Pflanzenkrebs und sein Erreger Pseudomonas tumefaciens.

IV. Mitteilung:

Eine neue Wirtspflanze (Dahlia variabilis Desf.) mit hochvirulentem Erreger.

[Aus der mikrobiologisch-chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem.]

Von **C. Stapp.**

Mit 4 Abbildungen im Text.

Wurzelkröpfe an Dahlien sind keine Seltenheit. Seit Jahren ist ihr Auftreten in Dahlienkulturen beobachtet worden. Doch war, soweit das bekannt geworden ist, niemals der ganze Bestand befallen, sondern die Wucherungen fanden sich meist nur an einzelnen Pflanzen. Größe und Gestalt der Wucherungen sind recht verschieden. Häufig zeigen sich nur einzelne Knollen der Dahlien durch Wucherungen deformiert, zuweilen werden aber auch andere Wurzelteile sowie die unterirdischen Stengelteile mit in die Zonen der pathologischen Geschwulstbildungen hineingezogen.

Werden die Wurzelkröpfe der Dahlien mit Wucherungen an anderen Pflanzen verglichen, so kann eine Ähnlichkeit mit solchen, die durch Pseud. tumefaciens hervorgerufen worden sind, nicht abgestritten werden. Es ist deshalb auch nicht besonders verwunderlich, daß von Praktikern [Berger (2), Mehlisch (8) in gärtnerischen Zeitschriften u. dgl. und von Wissenschaftlern [Pape, 1927 (9) und (1936 (10)] als Ursache Pseud. tumefaciens angegeben wird.

Ähnlich sind wohl die Angaben von E. Baudyš (1) aus der Tschechoslowakischen Republik 1929 zu werten, wenn er u. a. angibt, daß dort ganz bestimmte Blütenpflanzen, wie Pelargonien, Dahlien, Begonien und Petunien, durch Pseud. tumefaciens ernstlich angegriffen und abgetötet werden.

In einer neueren Veröffentlichung von K. Schilberszky [1935 (14)] findet sich eine Liste von Pflanzen, „bei denen sowohl unter natürlichen Umständen, als auch durch künstliche Infektionsversuche (gemeint ist durch Pseud. tumefaciens) Gallenbildungen hervorgerufen werden konnten"; in ihr ist auch Dahlia variabilis aufgeführt, und diese Angabe soll von E. F. Smith stammen.

Es ist mir trotz sorgfältiger Durchsicht der Arbeiten von E. F. Smith nicht möglich gewesen, eine diesbezügliche Angabe zu finden. Von E. F. Smith war mir eine kurze Veröffentlichung bekannt: „Fasciation of Dahlia" (15), in der von einer Verbänderung bei einer gefüllten rosa Dahlie berichtet wird und von der auch zwecks Isolierung des Erregers Platten gegossen wurden; es heißt aber dann: „Unfortunately the cultures were lost before experimental inoculations could be made". Eine Anfrage im

Herbst 1935 bei Prof. K. Schilberszky selbst konnte durch das Ableben desselben keine Erledigung mehr finden, und das Pflanzenpathologische Institut in Budapest, an das ich dieserhalb verwiesen wurde, teilte mir mit, daß es nicht gelungen sei, „den Ursprung des Zitates bezuglich Bacterium tumefaciens auf Dahlia variabilis ausfindig zu machen".

Charlotte Elliot, Washington, die ich ebenfalls schriftlich befragte, antwortete mir schließlich, daß auch ihr keine Veröffentlichung von E. F. Smith uber Dahlia als Wirtspflanze von Pseud. tumefaciens bekannt sei, was ich vermutete, denn in dem Manual of bacterial plant pathogens von 1930 hatte sie unter den Wirtspflanzen aus der Familie der Kompositen Dahlia nicht angefuhrt. Nelly Brown, eine langjahrige Mitarbeiterin von E. F. Smith, habe ihr von einem gelungenen Isolierungsversuch von Pseud. tumefaciens aus Dahlie berichtet, irgendwelche Publikationen hierüber seien aber auch dieser nicht bekannt[1]).



Abb. 1. Wurzelkropf tragende Dahlia variabilis. Auf etwa $^1/_2$ verkleinert.

Nach Sandhack (s. Pape) ist die Dahliensorte Salmonea besonders anfällig, nach Berger (2) sind es die Sorten Jersey Beauty, Andreas Hofer und Leuchtenberg. Letzterer gibt auch an, die Krankheit bisher kaum an starkwüchsigen Sorten gefunden zu haben.

Eigene Untersuchungen.

In früheren Jahren mehrfach ausgeführte Versuche, aus den Dahlientumoren Pseudomonas tumefaciens zu isolieren, hatten zwar

[1]) In Imp. Bur. Fruit Prod. Hort. Abstr. Vol. 3. 1933. p. 158 fand ich eine Literaturangabe: Cayeux, L., Note on bacterial and cryptogamic diseases found on the dahlia in France and their control, doch war es mir weder möglich, das Original einzusehen noch ein Referat darüber zu finden, so daß es mir unbekannt ist, ob und wieweit darin der Wurzelkropf bei Dahlie und sein Erreger behandelt sind.

immer zu einer reichlichen Entwicklung von Bakterien-Kolonien geführt, die sich im Aussehen nicht von denen der Pseud. tumefaciens unterschieden, nachfolgende Infektionsversuche mit den gewonnenen Reinkulturen an Dahlien waren jedoch stets völlig negativ verlaufen.

Im November 1933 wurde der Biologischen Reichsanstalt erneut eine kranke Dahlienpflanze mit kräftigen Wucherungen eingesandt (s. Abb. 1), bei der die Isolierungsversuche und die darauffolgenden Pathogenitätsprüfungen ein in mehrfacher Hinsicht interessantes Ergebnis zeitigten. Einige von den aus mehreren verschiedenen Stellen der Wucherungen isolierten Bakterienreinkulturen färbten den Bouillon-Agar in gleicher Weise mit dem Älterwerden der Kulturen braun, wie das für den seit Jahren hochvirulenten Stamm Chrysanthemum frutescens IIb Stapp bekannt ist.



Abb. 2. 2 Pelargonien geimpft am 4. Dez. 1935 mit Pseudomonas tumefaciens Stamm Dahlia Ra; aufgenommen am 27. Dez. 1935. Die rechte Pflanze ist bereits völlig abgestorben, von der linken Pflanze zeigt der obere Teil schon starke Absterbeerscheinungen. Auf etwa $^1/_3$ verkleinert.

In Pelargonien eingeimpft, zeigten sich die farblosen Stämme völlig avirulent, mit den das Substrat braunfärbenden Stämmen dagegen traten bereits 7 Tage nach der Infektion deutliche Zeichen der beginnenden Wucherung auf. Am 4. Dezember 1933 wurden die Infektionen an der gleichen Pelargoniensorte (Sorte x)[1]) und an Tomaten (Sorte Lukullus) mit 7 Tage alten Kulturen

[1]) Es handelt sich um die gleiche Sorte von Pelargonium zonale, die bei früheren Versuchen (siehe Stapp und Bortels, Der Pflanzenkrebs und sein Erreger Pseudomonas tumefaciens. I. Mitt.: Konstitution und Tumorbildung der Wirtspflanze. Ztschr. f. Parasitenkde. Bd. 3. 1931. S. 654—663) sehr günstig auf eine Infektion mit Pseud. tumefaciens reagierte und, da sie sich nicht mehr bestimmen läßt, von uns nun als „Sorte x" bezeichnet wird.

wiederholt und hatten bei den Pelargonien denselben deutlich positiven Erfolg, bei den Tomaten war der positive Befund jedoch noch nicht so deutlich. Es traten dann überraschenderweise bei beiden Pflanzenarten Welkeerscheinungen auf, und die Pflanzen waren bereits am 27. Dez. 1933, also 3 Wochen nach der Infektion, eingegangen (s. Abb. 2).

Die Impfungen wurden am 20. Dez. nochmals wiederholt und auf andere Wirtspflanzen ausgedehnt; das Alter der Kulturen war 1 und 12 Tage.

1. Impfungen an Pelargonien, Sorte x
2. ,, an Pelargonien, Sorte Sophie Kruger
3. ,, an Pelargonien, Sorte Lerchenmuller
4. ,, an Pelargonien, Sorte unbekannt, aber nicht x
5. ,, an Tomaten, Sorte Lukullus
6. ,, an Opuntien
7. ,, an Oleander

Die Infektionen bei 1—3, 5 und 7 waren nach 10 Tagen deutlich positiv, bei 4 schwach positiv und bei 6 erst nach 14 Tagen als positiv zu bezeichnen. Die Tomatenpflanzen waren nach 10 Tagen deutlich welk und nach 14 Tagen (am 3. Jan. 1934) eingegangen. Die Pelargonien der Sorte x waren nach 4 Wochen tot.

Diese stark toxische Wirkung des Erregers war bisher niemals bei Infektionen mit anderen Stämmen von Pseud. tumefaciens beobachtet worden und ist mir auch aus der Literatur nicht bekannt. Welkeerscheinungen waren immer erst dann aufgetreten, wenn der Tumor durch seine Größe und seine Lage die Wasserversorgung der oberhalb der Infektionsstelle liegenden Pflanzenteile behinderte. Hier konnte der Tumor nicht die Ursache sein, denn er war meist noch relativ schwach entwickelt (s. Abb. 2), wenn die Welke- und Absterbesymptome einsetzten.

Da aus den Welkeerscheinungen bei den Tomaten zu schließen war, daß die Wurzelkropferreger innerhalb der Wirtspflanzen „wandern", wurde eine eben abgestorbene Tomatenpflanze mit sterilem Messer zerschnitten und der Versuch gemacht, den Erreger in verschiedener Entfernung von der Infektionsstelle zu reisolieren; so wurden am 4. Jan. 1934 Proben entnommen:

0,5 cm unterhalb der Impfstelle
10,0 ,, ,, ,, ,, und
20,0 ,, ,, ,, ,,

Am 8. Jan. 1934 waren auf den Platten mit den Proben 0,5 und 10,0 cm unterhalb der Impfstelle die typischen Tumefaciens-Kolonien entstanden, die sich auch bei erneuten Infektionsversuchen als sehr virulent erwiesen; die am 22. Jan. an Pelargonien, Sorte x, ausgeführten Impfungen waren bereits am 27. Jan. deutlich angegangen.

Eine ältere Tomatenpflanze, die Ende Dezember 1933 geimpft war, bei der aber erst am 30. Jan. 1934 starke Welkeerscheinungen aufgetreten waren und die einen kräftigen Tumor an der Infektionsstelle gebildet hatte, wurde wiederum steril zerschnitten und Proben entnommen:

1 cm unterhalb des Tumors
11 ,, ,, ,, ,,
21 ,, ,, ,, ,,
31 ,, ,, ,, ,,

Hier waren infolge der längeren Infektionszeit die Bakterien nicht nur in einer Entfernung von 21 cm unterhalb des Tumors durch Herauszüchtung

nachweisbar, sondern auch in der immerhin erheblichen Entfernung von 31 cm. Daß es sich in allen diesen Fällen tatsächlich um Pseud. tumefaciens handelte, wurde nach Abimpfung der Kolonien von den Gußplatten durch Infektionsversuche sichergestellt. Auch mikroskopisch ließen sich bis zu 10 cm unterhalb der Impfstelle Bakterien noch in den Tracheen ziemlich eindeutig nachweisen, in größeren Abständen wurde der mikroskopische Nachweis unsicher.

Am 25. April 1934 wurden vergleichsweise mit Pseud. tumefaciens Stamm Chrys. IIb und Stamm Dahlia Ra[1]) infiziert:

je 4 Pflanzen von Datura Stramonium
je 5 „ von Datura Tatula[2])
je 4 „ von Lycopersic. esculentum (Sorte Tookswood)
je 3 „ von Pelargonium zonale, Sorte x

Alle Infektionen waren erfolgreich, die Tumoren an den hellblau blühenden Datura-Pflanzen waren besonders groß, und zumeist waren die Wucherungen mit Dahlia Ra mehr glatt, die von Chrys. frut. IIb mehr blumenkohlartig zerklüftet. Häufig waren auch die durch Dahlia Ra hervorgerufenen Tumoren kräftiger als die durch Chrys. IIb erzielten.

Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten bei Infektionen am 2. Mai 1934

an je 6 Tomatenpflanzen und
je 3 Datura Tatula.

Von den am 25. April mit Dahlia Ra geimpften Tomatenpflanzen wurden am 16. Mai die oberen Triebspitzen abgeschnitten.

Am 23. Mai waren 3 der am 25. April und 2. Mai mit Dahlia Ra geimpften Pflanzen (Tomate) nach vorherigem Welken eingegangen.

Am 17. Dez. 1934 wurden 2 weißblühende Dahlienpflanzen aus dem Freiland herausgenommen, davon je 2 Knollen und 2 junge Triebe mit Dahlia Ra geimpft, in Töpfe verpflanzt, im Gewächshaus aufgestellt. Am 24. Okt. 1934 ließ sich bereits eine deutliche Tumorbildung an den Impfstellen der Dahlientriebe erkennen und ebenso traten überraschenderweise einige Tage später an 2 etwa 5 cm unterhalb des Tumors befindlichen Blattnarben Wucherungen auf, also an den Stellen, an denen 2 Blätter nach dem Einbringen ins Gewächshaus von der Pflanze abgefallen waren (s. Abb. 3). Es wird mit Bestimmtheit angenommen, daß durch den Wechsel von Freiland zu Gewächshaus in dieser Jahreszeit ein beschleunigtes Welken der Blätter bedingt und die Blattnarbe beim Abfallen der Blätter noch nicht „normal" ausgebildet war. Infolgedessen dürften äußere Verletzungen des zarten Gewebes an der Trennungsstelle eingetreten und hier der Entstehungsort der neuen Tumoren, die an Größe den alten Tumor übertrafen, zu suchen sein. Von der zweiten Dahlienpflanze waren leider die oberirdischen Triebe im Gewächshaus vorzeitig abgestorben.

Am 3. Dez. wurde die am 17. Okt. mit Dahlia Ra geimpfte noch lebende Dahlie aus dem Topf herausgenommen; die oberirdischen Pflanzen-

---

[1]) Der virulenteste aus Dahlie isolierte Stamm von Pseud. tumefaciens ist kurz „Dahlia Ra" genannt worden.

[2]) Die hellblau blühende Datura wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hase anläßlich einer Spanienreise von dort mitgebracht und von Herrn Dr. Melchior, Botanisches Museum, Berlin, als Datura Tatula L. (= Dat. Stramonium L. var. calybaea Koch) bestimmt, wofür beiden Kollegen nochmals an dieser Stelle verbindlichst gedankt sei.

teile waren zumeist abgestorben, die Impfungen an den Knollen alle erfolgreich gewesen. So zeigt z. B. die Abb. 4 einen etwa walnußgroßen Tumor an einer Knolle, der also innerhalb eines Zeitraumes von noch nicht ganz 7 Wochen entstanden war. Aus einem derartigen Tumor wurde der Erreger wiederum reisoliert und am 8. Dez. in x-Pelargonien eingeimpft. Nach 8 Tagen war ein deutliches Entstehen von Tumoren zu sehen, am 22. Jan. 1935 bildete sich um die Tumoren eine 2 mm breite, schwarze Zone, während die Tumoren langsam eintrockneten.



Abb. 3. Dahlia variabilis, an einem Seitentrieb künstlich infiziert mit Pseud. tumefaciens Stamm Dahlia Ra am 17. Okt. 1934; aufgenommen am 24. Nov. 1934. Der Primärtumor links oben ist kleiner als die beiden Sekundärtumoren, die später an den Blattnarben entstanden sind. Auf etwa $^{2}/_{3}$ verkleinert.

Am 2. Jan. 1935 mit dem Dahlia Ra-Stamm geimpfte x-Pelargonien zeigten am 26. Jan. ein völliges Abwelken der infizierten Triebe. Am 12. Jan. 1935 mit anderen x-Pelargonien angestellte gleiche Versuche hatten am 28. Jan. 1935 denselben Erfolg.

Nachdem früher experimentell und mikroskopisch festgestellt worden war, daß sich der Erreger eine gewisse Zeit nach der künstlichen Infektion auch in größeren Entfernungen unterhalb des Ortes der Einimpfung nachweisen ließ, wurde versucht, ihn auch aus größeren Entfernungen oberhalb der Einstichstelle zu isolieren. Es wurden deshalb am 15. Aug. 1934 einige Tomaten ziemlich nahe über der Bodenoberfläche mit Dahlia Ra geimpft und am 9. Sept. 1934 abgeschnitten. An den Pflanzen hatten sich nur kleinere Tumoren gebildet und aus den Stengelstücken, die 10, 30, 50 und 70 cm oberhalb des Tumors entnommen waren, gelang merkwürdigerweise die Isolierung der Pseud. tumefaciens nicht. Wie bei den früheren Versuchen ließen sich jedoch unterhalb die Bakterien bis auf etwa 10 cm Entfernung von der Einstichstelle mikroskopisch feststellen. Es wird später gezeigt werden, daß sich Pseud.

tumefaciens aber doch sowohl nach unten als auch nach oben im Gewebe ausdehnt.

Hier sei noch erwähnt, daß der Stamm Dahlia Ra seit Frühjahr 1935 seine Fähigkeit, die Pflanzen zum Welken bzw. durch seine Ausbreitung in denselben zum Absterben zu bringen, ziemlich weitgehend verloren hat.

Über die Möglichkeit der Ausbreitung von Pseud. tumefaciens in der Wirtspflanze liegen bereits Ergebnisse vor, so u. a. von Riker (11, 12), Robinson und Walkden (13), Ivanoff und Riker (6), Hill (4), Hill, Brittingham, Gibbons und Watts (5), Hamdi (3) und Suit und Eardley (18).



Abb. 4. Dahlia variabilis, an einer knollig verdickten Wurzel mit Pseud. tumefaciens Stamm Dahlia Ra am 17. Okt. 1934 infiziert; aufgenommen am 2. Dez. 1934. Auf etwa $^1/_2$ verkleinert.

Letztere haben nach einer Infektion mit besonderer Tauchmethode die Bewegung der Pseud. tumefaciens in den Gefäßen der Leitbündel von Tomate, Tabak, Chrysanthemum frutescens und Bryophyllum calycinum verfolgt. Sie erzielten die Bildung von Sekundärtumoren an Tomaten durch entsprechende Verletzung noch 40,5 cm oberhalb der primären Infektionsstelle und bei Tabak noch in einer Entfernung von 30,5 cm. Bei den beiden anderen Wirtspflanzen war die Ausbreitung nicht so erheblich. Wurden Tomatenpflanzen an der Spitze infiziert, so konnte von Suit und Eardley der Erreger nur in etwa 2,5 cm, nicht aber in 5 cm Entfernung nach unten nachgewiesen werden. Ebenso war nach Infektion am Blattstiel der Erreger nur oberhalb und nicht mehr unterhalb des Stengelknotens festzustellen. Daraus folgern sie, daß die Bewegung der Bakterien durch den Transpirationsstrom beeinflußt wird.

Es steht das im Widerspruch zu den Angaben von Hill, der die Ausbreitung der Bakterien nicht in Abhängigkeit vom Saftstrom fand. Hills Ergebnisse stimmen dagegen mit den meinigen überein. Auch ich konnte keine schnellere Bewegung in Richtung des Transpirationsstromes nachweisen, wohl aber eine erhebliche „Abwärtswanderung" entgegen dem Saftstrom. Dennoch halte ich die aktive Fortbewegung der Bakterien in den Leitbündeln für bedeutungslos, vermute vielmehr, daß sie passiv ist. Eine Stütze findet meine Vermutung vor allem in früheren Beobachtungen mit geißellosen Bakterien, z. B. dem Bacterium sepedonicum, das bei Kartoffeln eine Tracheobakteriose hervorruft. Es wurde damals [1930, S. 793 (16)] von mir schon über die Untersuchungsbefunde an künstlich infizierten Kartoffeltrieben folgendes gesagt: „Überhaupt konnte bei diesen Triebinfektionen beobachtet werden, daß die Wanderung der Bakterien nach unten im allgemeinen schneller vor sich ging als nach oben; es ist das deshalb besonders auffallend, weil die Annahme berechtigt erschien, die Bakterien würden mit dem in den Gefäßen nach oben geführten Wasser schneller in dieser Bewegungsrichtung weitergetragen als umgekehrt; denn eine aktive Fortbewegung kommt ihnen, da sie völlig unbegeißelt sind, doch nicht zu."

Tabelle 1.

Lfd. Nr.	Entfernung der Tumoren vom Primärtumor unterhalb cm	oberhalb cm	Tumorbildung
1	—	1,0	ziemlich kräftig
2	—	—	—
3	—	12,5	ziemlich kräftig
	—	7,0	etwas kleiner
4	—	2,0	sehr deutlich
	13,0	—	klein
5	10,0	—	sehr deutlich
	12,5	—	klein
	8,0	—	,,
	6,5	—	,,
6	15,0	11,0	schwacher
	8,0	—	,,
	5,0	—	,,
	4,0	—	,,
7	—	—	—
8	9,5	—	klein
9	8,0	—	kraftig
10	13,0	—	klein, aber deutlich
11	—	—	—
12	8,0	—	klein
13	2,0	—	kräftig
	4,0	—	schwächer
14	15,0	—	kraftig

Bei Tomatenpflanzen, die am 22. Mai 1935 mit Stamm Dahlia Ra geimpft worden waren, wurden am 16. Juni, nachdem also anzunehmen war, daß die Bakterien sich weit genug von der Infektionsstelle nach oben und unten ausgedehnt hatten, mit sterilen Nadeln, an den entlegensten Stellen beginnend und nach dem Tumor hin fortschreitend, Einstiche in die Stengel gemacht, und zwar nach Möglichkeit so, daß die Leitbündel, die in der Verlängerung des Tumorsitzes lagen, getroffen wurden. Welkeerscheinungen

wurden nicht beobachtet, die Tumoren an der primären Einstichstelle waren nicht groß, wahrscheinlich deshalb, weil die Pflanzen in stark besetztem Gewächshaus nicht genügend Licht gefunden hatten und etwas vergeilt waren. Tab. 1 zeigt den Erfolg der nachträglichen Verletzung. Daraus geht eindeutig hervor, daß erstens der Erreger in der Tomate „wandert" und zweitens nur dann „Sekundärtumoren" aufgetreten sind, wenn die Pflanze nachträglich entsprechend verletzt wurde. Die Ergebnisse von Suit und Eardley — die Arbeit war mir bei Durchführung meiner Versuche noch nicht bekannt — erfahren damit hinsichtlich der Bildung von Sekundärtumoren durch Anstechen infizierter Pflanzen ihre Bestätigung.

Die Entstehung von Sekundärtumoren ohne äußere Verletzung, über deren gelegentliches Vorkommen Suit und Eardley berichten, konnte von mir bisher nicht beobachtet werden. Der auf S. 277 beschriebene Versuch mit Dahlien, bei denen Tumoren an den Blattnarben unterhalb der Infektionsstelle auftraten, wird, selbst wenn die von mir gegebene Deutung abgelehnt werden sollte, auch nicht als sicherer Beweis für das Auftreten von Sekundärtumoren ohne Verletzung angesehen werden dürfen.

In eigenen früheren Untersuchungen (17) war bereits gezeigt worden, daß die verschiedenen Stämme von Pseud. tumefaciens nicht alle identisch waren, sondern sich serologisch unterschiedlich verhielten. So wurde z. B. der Stamm Chrys. frut. IIb, der 1926 von mir aus Chrysanthemum frutescens isoliert worden war, von Kaninchenserum, das durch Injektion mit dem Hopfenstamm von Smith gewonnen war, nicht agglutiniert, stimmte aber in seinem serologischen Verhalten überein mit mehreren aus Apfelbäumchen isolierten Stämmen und einem aus der Weinrebe gezüchteten Stamm. Ein Bakterienstamm aus einem Pfirsich-Tumor war verschieden von einem aus Stachelbeere und von Stamm Chrys. frut. IIb.

Obwohl demnach serologisch sicher feststellbare „Art"unterschiede vorhanden sind, zeigen sich aber morphologisch und physiologisch so viele Übereinstimmungen, daß ich 1927 vorschlug, „vorläufig die Bezeichnung Bact. resp. Pseud. tumefaciens für die ganze Gruppe beizubehalten, ebenso wie man von dem Bacillus coli als einem zur Coli-Gruppe gehörigen Bakterium spricht". Bisher ist davon nicht abgewichen worden, und es besteht auch z. Z. kein Grund, die Gruppenbezeichnung aufzugeben.

In Hinsicht auf die hohe Virulenz des Dahlienstammes schien es aber von Wichtigkeit, zu prüfen, mit welchen bekannten anderen Tumefaciens-Stämmen dieser serologisch übereinstimmt.

Das Immunserum wurde in der üblichen Weise gewonnen. Die Agglutination erfolgte nicht wie mit anderen Bakterienarten- oder -gruppen grob- bis feinflockig, sondern deutlich fädig. Diese Eigentümlichkeit war mir schon bei den ersten serologischen Untersuchungen 1926 mit Pseud. tumefaciens aufgefallen. Sie veranlaßte mich, Herrn Prof. Dr. Schloßberger, den Serologen des Institutes „Robert Koch", Berlin, um eine Nachuntersuchung zu bitten unter Übersendung einer Kultur des Stammes Dahlia Ra und des entsprechenden Serums. Die Besonderheit der Agglutination von Pseud. tumefaciens wurde mir daraufhin bestätigt und eine weitere Prüfung mit dort frisch hergestelltem Immunserum brachte

den gleichen Befund[1]). Herr Prof. Schloßberger machte mich dann auf die Veröffentlichung von Kauffmann (7) aufmerksam, in der derselbe auf dieses sonderbare agglutinatorische Verhalten einer Glattform des von ihm benutzten Tumefaciens-Stammes hingewiesen hat und ebenso darauf, daß die Tumefaciens-Stämme dazu neigen, „in NaCl-Lösung und in Normalserum spontan zu flocken, meist aber erst nach 2—24 Std.“.

Ich fand derartige fädige Agglutinationen bei allen Tumefaciens-Stämmen, auch bei der R-Form des Stammes Chrys. frut. IIb. Wo Abweichungen zutage traten, waren sie stets nur graduell.

Für die serologischen Identitätsuntersuchungen wurden folgende Stämme von Pseud. tumefaciens herangezogen:

1. Stamm Dahlia Ra Orig.
2. „ Dahlia Ra, reisoliert aus Tomatentumor
3. „ Chrys. frut. IIb Stapp
4. „ Chrys. frut. Ia Stapp
5. „ Smith aus Hopfen
6. „ Smith aus Stachelbeere
7. „ Smith aus Weide
8. „ Smith aus Pfirsich
9. „ Pirus comm. M[2].)

Bei der Agglutination zeigte sich allein der Stamm Smith aus Weide indifferent, Stamm Chrys. Ia wurde bis zur Verdünnung 1 : 400 noch agglutiniert, Stamm Smith aus Hopfen bis zur Verdünnung 1 : 3000, die Stämme Chrys. IIb, Smith aus Stachelbeere, aus Pfirsich und der Birnenstamm agglutinierten fädig bis 1 : 10 000. Auch die Kontrolle in NaCl wies deutliche fädige Agglutination auf, wenn auch nicht so stark, wie die Röhrchen mit dem weniger verdünnten Serum. Es war schon deshalb nicht möglich, aus dem Agglutinationsergebnis sicher auf Identität zu schließen. Die Befunde der Präzipitationsversuche waren aber eindeutig. Sie ergaben eine Übereinstimmung der beiden Dahlienstämme nur mit Stamm Chrys. IIb.

Zusammenfassung.

Als Erreger des Wurzelkropfes der Dahlien wurde Pseud. tumefaciens nachgewiesen.

Der aus Dahlientumoren isolierte Stamm zeichnet sich durch eine außerordentlich starke Virulenz aus. Er ist nicht nur für Dahlie (Knollen und Kraut) pathogen, sondern vermochte in der ersten Zeit nach der Reinzüchtung Pelargonien und Tomaten bereits kurze Zeit nach der Infektion zum Welken und Absterben zu bringen. Dieses Absterben war nicht auf die mechanische Behinderung der Nährsalz- und Wasserzufuhr durch den entstandenen Tumor zurückzuführen, sondern muß durch die toxische Wirkung der hochvirulenten Bakterien bedingt gewesen sein.

Das Welken der Pflanzen kurz nach der Infektion sprach dafür, daß der Erreger vom Orte der künstlichen Einimpfung „abwanderte“. Der Beweis hierfür ließ sich dadurch erbringen, daß z. B. Pseud. tumefaciens etwa 5 Wochen nach der künstlichen Infektion in 31 cm Entfernung von der Impfstelle aus dem Gewebe herauszüchtbar war.

[1]) Herrn Prof. Dr. Schloßberger sei an dieser Stelle für seine Bemühungen nochmals verbindlichst gedankt.

[2]) Dieser Stamm wurde im hiesigen Laboratorium von Dr. Heinr. Müller aus einem Birnentumor im Herbst 1935 isoliert.

Sekundärtumoren konnten erzeugt werden, wenn die Pflanzen einige Zeit nach der Infektion mittels steriler Nadeln in größerer Entfernung von der Infektionsstelle angestochen wurden. Sie traten an Tomaten ohne Verletzungen nicht auf.

Der aus Dahlien isolierte Stamm von Pseud. tumefaciens ist identisch mit dem Stamm Chrys. IIb, da er das gleiche serologische Verhalten zeigt wie dieser.

Literatur.

1. Baudyš, E., Fitopathologické poznámky. V. (Ochrana Rostlin. Bd. 9. 1929. S. 108—128.) — 2. Berger, R., Wurzelkropf an Dahlien. (D. Blumen- u. Pflanzenbau. Bd. 38. 1934. S. 167.) — 3. Hamdi, H., Über die Histogenese, Bau und Natur des sog. Pflanzenkrebses und dessen Metastasen. (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 30. 1930. S. 547—552.) — 4. Hill, I. B., The migration of Bact. tumefaciens in the tissue of tomato plants. (Phytopathology. Vol. 18. 1928. p. 553—564.) — 5. Hill, I. B., Brittingham, W. H., Gibbons, F. P., and Watts, G. W., Further notes on Bacterium tumefaciens and its host relationship. (Phytopathology. Vol. 20. 1930. p. 179—186.) — 6. Ivanoff, S. A., and Riker, A. J., Studies in the movement of the crowngall organism within the stems of tomato plants. (Phytopathology. Vol. 20. 1930. p. 817—828.) — 7. Kauffmann, F., Über die Veränderlichkeit von Tumefaciensbacillen. (Ztschr. f. Krebsforsch. Bd. 26. 1928. S. 330—332.) — 8. Mehlisch, Wurzelkropf an Dahlien. (Gärtner-Börse. Bd. 17. 1935. S. 347.) — 9. Pape, H., Die Krankheiten und Schädlinge der Dahlie. In: Sandhack, Dahlien und Gladiolen. Berlin 1927. S. 150—198. — 10. Pape, H., Die Praxis der Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen der Zierpflanzen. 2. Aufl. Berlin (Verlag P. Parey) 1936. — 11. Riker, A. I., Some relations of the crowngall organisms to its host tissue. (Journ. Agric. Res. Vol. 25. 1923. p. 119—132.) — 12. Riker, A. I., Some morphological responses of the host tissue to the crowngall organism. (Journ. Agric. Res. Vol. 26. 1923. p. 425—436.) — 13. Robinson, W., and Walkden, H., A critical study of crowngall. (Ann. of Bot. Vol. 37. 1923. p. 299—324.) — 14. Schilberszky, K., Beiträge zur Biologie von Pseudomonas tumefaciens. (Ztschr. f. Pflanzenkrankh. u. -schutz. Bd. 45. 1935. S. 146—159.) — 15. Smith, E. F., Fasciation of Dahlia. Journ. of Heredity. Vol. 17. 1926. 1 S. (Sonderdruck.) — 16. Stapp, C., Beiträge zur Kennntis des Bacterium sepedonicum Spieckerm. et Kotth, des Erregers der „Bakterien-Ringfäule" der Kartoffel. (Ztschr. f. Parasitenkde. Bd. 2. 1930. S. 756—823.) — 17. Stapp, C., Der bakterielle Pflanzenkrebs und seine Beziehungen zum tierischen und menschlichen Krebs. (Ber. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 45. 1927. S. 480—504.) — 18. Suit, R. F., and Eardley, E. A., Secondary tumor formation on herbaceous hosts induced by Pseudomonas tumefaciens. (Scient. Agric. Vol. 15. 1935. p. 345—357.)

Nachdruck verboten.

Umwandlung von Streptococcus lactis (lacticus, acidi lactici) in Streptococcus faecium (faecalis, Enterococcus).

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preuß. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Kiel. Direktor: Prof. Dr. W. Henneberg †.]

Von W. Storck.

Vorliegende Umzüchtungsversuche wurden noch auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. Henneberg im November 1935 begonnen. Sie entstanden aus folgenden Überlegungen und Anregungen heraus: 1. Mensch und Tier bringen durch den Genuß von Milch und Milcherzeugnissen sehr viele Milchsäurestreptokokken, vor allem Str. lactis in ihren Körper, während man im Darminhalt selbst neben sehr wenigen Str. lactis hauptsächlich Str. faecium angereichert findet. Str. lactis könnte demnach im menschlichen oder tierischen Körper evtl. eine Umwandlung durchmachen. 2. Das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen Str. lactis und Str. faecium ist die Hitzeresistenz des letzteren neben der Verschiedenheit der Lackmusmilchreaktion und des Arabinosesäuerungsvermögens. Die erst vor kurzer Zeit gelungene Hitzeresistenz-Anzüchtung von Bact. coli auf Str. lactis angewendet, könnte evtl. eine Umwandlung herbeiführen. Vielleicht gab auch 3. die Arbeit von Demeter (2) und Gundel Veranlassung, der auf Grund seiner Untersuchungen „eine prinzipielle Trennung zwischen den typischen Milchsäurebakterien und den Faekalstreptokokken“ nicht für durchführbar hält, und daß „der bisher als Str. lactis bezeichnete Organismus höchstens als eine besonders häufig in Milch vorkommende „Standortsform“ des Faekalstreptokokkus aufzufassen ist“.

Allgemeines über Streptococcus lactis und Streptococcus faecium.

Eine morphologische Unterscheidung der beiden Arten ist nicht möglich, da beide typisch sowohl in „Güntheriform“ als auch in kleinen Ketten mit ovalen Gliedern wachsen. Nach einer mündlichen Mitteilung Hennebergs soll Str. faecium jedoch im mikroskopischen Bilde lichtbrechender sein. Da zu dieser Beobachtung eine Erfahrung nötig ist, wie sie vielleicht nur der große Morphologe Henneberg besaß, kämen also nur physiologische Unterschiede in Frage, auf die sich auch unsere Untersuchungen stützten. Der Vollständigkeit halber sei hier zunächst auf die neuere Literatur eingegangen, soweit sie das Vorkommen von Str. lactis und Str. faecium betrifft, als auch das physiologische Verhalten besonders hinsichtlich der Hitzeresistenz, der Lackmusmilchprobe und der Pentosenvergärung berührt.

Vorkommen.

Kreipe untersuchte 24 Kuhpansen und fand unter anderen Milchsäurebakterien, die hier nicht interessieren, fast stets Str. faecium, nie Str. lactis. Ebenso konnte Albr. Voß im Dünndarm und Rectum des Rindes stets Str. faecium, jedoch nie Str. lactis feststellen. Maurer isolierte aus menschlichen Fäzes

von 6 Personen Str. faecium laecium (10 Stämme), von je 4 Personen Str. lactis (5 Stämme) und dem Str. faecium nahestehende Arten (6 Stämme). Str. lactis hält Maurer nicht für endemische Darmbewohner, sondern nur für Passanten. Außerdem kann nur ein Lactis-Stamm von Maurer als typisch angesprochen werden, da 4 Stämme auch Arabinose vergärten. Aus der Angabe: „Dicklegung der Magermilch in 1—2 Tagen unter Bildung von 0,57—0,78% Milchsäure" ist leider nicht ersichtlich, in welcher Zeit die 4 fraglichen Lactis-Stämme die Koagulation bewirkten. Da nach seiner eigenen Angabe die 10 Fäzes-Stämme in 2—7 Tagen ebenfalls 0,41 bis 0,65% Milchsäure bildeten, kann es sich bei den fraglichen Stammen ebenfalls um Str. faecium handeln. Nach Seibel finden sich Milchsäure-Streptokokken (u. a. lactis und faecium) am ganzen Kuhkörper. Str. faecium konnte Seibel fast stets aus pasteurisierter Milch (63° — 30 Min.) isolieren, jedoch nie Str. lactis. Seibel ist der Meinung, daß früheren Forschern, die glauben, einen „hitzeresistenten" Str. lactis gefunden zu haben, ein Irrtum unterlaufen ist. Stölting und Diethelm fanden im Tilsiter Käse neben anderen Milchsäurebakterien nur Str. lactis, der typische Str. faecium konnte von ihnen nie isoliert werden. Grenz bezeichnet das Vorkommen des letzteren im Tilsiter Käse als sehr gering. Henneberg (2) schreibt: „Die häufigste Milchsäure-Bakterienart (Streptococcus lactis), die bei gewöhnlicher Temperatur die Milch zur Säuerung und Gerinnung bringt, in den Buttereien als Säurewecker Verwendung findet und daher auch stets in der Buttermilch (und in der Butter) im lebenden Zustande vorkommt, ebenso auch die vorherrschende Art im Trinkkefir ist, kann sich auch nach unseren Untersuchungen im Menschendarm nicht ansiedeln! Im Menschendarm finden sich an ihrer Stelle der Streptococcus thermophilus, glycerinaceus und faecium." An anderer Stelle (3): „Sehr bemerkenswert erscheint, daß der gewöhnliche Milchsäurestreptokokkus (Str. lactis) weder in der Kuh, noch im Menschen zur Vermehrung kommen kann. Dieser typische Milch- und Käsepilz kommt also nicht aus dem Kuhdarm!"

Demeter (2), Gundel u. a. dagegen bejahen hauptsächlich auf Grund ihrer Ansicht, daß Str. faecium lediglich eine „Standortsform" des Str. lactis sei, das normale Vorkommen des Str. lactis im Darm. Zahlreiche Versuche, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann (Henneberg, Gundel, Maurer), Str. lactis durch Sauermilchgenuß im Darm von Mensch und Tier anzusiedeln oder überhaupt nur nachweisbar wiederzufinden, verliefen im ersteren Falle stets, im letzteren meist negativ, während solche mit Str. faecium stets gelangen. Oft konnte Str. faecium sogar als einzige Kultur isoliert werden, während beim Aufhören von Milchgenuß (Entzug der wichtigsten Nährstoffquelle) der prozentuale Anteil des Str. faecium an der Gesamtflora nach kurzer Zeit (3 bis 5 Tage) zurückging.

Die Herkunft des Str. faecium und seine Regenerationsstätte ist sicherlich der Darm, woher aber stammt der häufigste Milchsäure-Streptokokkus? Diese Frage wirft auch Demeter auf, ohne sie jedoch u. E. („Standortsform") zu klären. Deger u. a. fanden Str. lactis auf Gräsern, Grapengeter u. a. dagegen nicht. Esten hält das Maul der Kuh für den Hauptaufenthaltsort von Str. lactis. Eine andere Lösung glaubt Bång gefunden zu haben. Da seine Untersuchungen jedoch noch unveröffentlicht sind, soll auch hier nicht vorgegriffen werden. Auf die Arbeiten von Demeter wird noch häufiger eingegangen und zu ihnen Stellung genommen werden müssen.

Hitzeresistenz, Lackmusmilchprobe und Pentosenvergärung.

Bei den eigenen Untersuchungen wurden zur Unterscheidung von Str. lactis und Str. faecium drei Eigenschaften herangezogen, die als Hauptunterscheidungsmerkmale zwischen diesen beiden Arten gelten, und zwar 1. die Hitzeresistenz, 2. die Lackmusmilchprobe und 3. die Fähigkeit der Pentosenvergärung.

Es scheint mir notwendig, neuere Arbeiten, die sich auf obige drei Punkte beziehen, kritisch zu beleuchten und klarzustellen bzw. festzulegen, wie das typische Verhalten von Str. lactis und Str. faecium zu diesen drei Punkten sich nach unserer Erfahrung auswirkt.

1. Hitzeresistenz. Unter Hitzeresistenz ganz allgemein versteht man die Fähigkeit gewisser Mikroorganismen eine gewisse Temperatur eine bestimmte Zeit zu überdauern. Man spricht von der Hitzeresistenz der Sporen oder der vegetativen Zellen selbst, der Bakterien. Uns interessiert nur die letztere. Wirth prüfte die Hitzeresistenz bei 60° C und unterscheidet bei den Milchsäurestreptokokken zwei Unterarten: Str. lactis a (Heim), der durch ¼ stünd. Einwirkung abgetötet wird und Str. lactis b (thermoresistent), der durch ¼ stünd. Einwirkung auch bei 65° C nicht abgetötet wird. Str. lactis b dürfte u. E. mit dem Str. faecium identisch sein. Schönfeld fand von 60 aus Stuhl gezüchteten, also „sicheren" Enterokokkenstämmen: 14 = 23,3% thermolabil, in 15 Min. ebenfalls bei 60° C abgetötet, 46 = 76,7% (bzw. 7 = 11,7%) thermoresistent 15 Min. 60° C und 39 = 65% thermoresistent ½ Std. bei 60° C. Auch Demeter (2) prüfte die Hitzeresistenz bei 60° C ½ Std. lang und fand 90% aller isolierten Streptokokken als „Hitzeresistent". Dieser hohe prozentuale Anteil der „hitzeresistenten" Streptokokken ist nicht weiter verwunderlich, bezeichnen doch Ayers und Johnson (zitiert nach Meyer und Schönfeld) die Widerstandsfähigkeit von Str. lactis gegenüber ½ stünd. Erhitzung auf 60° C als charakteristisch. Auch Seibel fand bei seinen Abtötungsversuchen in Milch bei ½ stünd. Erhitzungsdauer 60—61° C für Str. lactis, während Str. faecium ½ Std. bei 63° C überlebte. Nach Orla-Jensen wird der Str. lactis in ¼ Std. bei 70°, Str. faecium erst bei 75° abgetötet. Bagger berichtet, daß 95% der Enterokokken 1 Std. 60° C überlebten.

Im Kieler Bakt. Institut gilt für die Hitzeresistenzprüfung nur eine Erhitzung von 63° C während einer Dauer von 30 Min., wie sie in der Praxis für die Dauerpasteurisierung (62—65° — 30 Min.) gesetzlich verlangt wird. Alle Bakterien, die diese Erhitzung nicht aushalten, werden als nicht-hitzeresistent bezeichnet. Wir sehen in dieser Hitzeresistenz (63° C — 30′) ein sicheres Unterscheidungsmerkmal von Str. lactis und Str. faecium. Der Str. faecium übersteht stets die Dauerpasteurisierung, während der typische Str. lactis, der nach Orla-Jensen zu den am wenigsten Hitze vertragenden Milchsäurebakterien gehört, sie nie übersteht. Wir lehnen deshalb eine Erhitzung auf lediglich 60° C — 30 Min. für eine Unterscheidung zwischen hitzeresistenten und nicht-hitzeresistenten Milchsäurestreptokokken grundsätzlich ab.

2. Lackmusmilchprobe. Eine geschichtliche Übersicht der Anwendung des Lackmusfarbstoffes in der Bakteriologie gibt Demeter (1). Die Angaben von Heim scheinen uns für die Identifizierung des Str. lactis von Wichtigkeit zu sein. Alle neueren Arbeiten stützen sich auf diese Angaben und können sie zum größten Teil auch bestätigen. Wirth fand für seinen Str. lactis a (Heim) ebenfalls die Lackmusmilchreaktion nach Heim 1a, während der thermoresistente Stamm, Str. lactis b (Str. faecium), nach 2—8 Tagen Rötung und Gerinnung, dann erst Reduktion von unten zeigte. Schönfeld gibt an, daß von den 60 Enterokokken-Stämmen 18 St. die Lackmusmilch nach Heim 1a typisch veränderten, 5 keine Veränderung hervorriefen, alle anderen lediglich Gerinnung und Rötung zeigten. Auf Grund dieser Verschiedenheit verwirft Schönfeld die Lackmusmilchprobe zur Charakterisierung der Enterokokken. Wir glauben jedoch auf Grund der Hitzeresistenzprüfung und Lackmusmilchprobe (wahrscheinlich nicht lange genug beobachtet), daß Schön-

feld ein Irrtum unterlaufen ist und die untersuchten „sichern" Enterokokken z. T. Str. lactis waren, was nach obigen Ausführungen möglich ist. Demeter (2) beobachtete häufig bei Str. faecium in Lackmusmilch einen direkten Umschlag von Blau in Rot bei gleichzeitiger Gerinnung und langsamer Reduktion von unten und nannte sie pseudotypisch. Er fand für 89,8% aller aus Milch isolierten Streptokokken die typische (Heim 1a) und für 8,5% die pseudotypische (Heim 2a) Lackmusmilchreaktion. Diese Angaben stimmen ungefähr mit den von uns gefundenen Zahlen für die Isolierung von Streptokokken aus Rohmilch überein, für die wir ca. 85% Str. lactis mit typischer und ca. 8% Str. faecium mit pseudotypischer Lackmusmilchreaktion fanden. Nach Stölting scheint bei der Lackmusmilchprobe die Temperatur zur Koagulation der Milch, ob 30 oder 37° C, eine geringere Rolle zu spielen als die Zeitspanne (24 Std.), während Sach für die Lackmusmilchreaktion für Str. lactis auch eine Einhaltung der Temperatur von 30° C für wichtig hält im Gegensatz zu Demeter, der für seine Lactis-Stämme eine Optimaltemperatur von 37° C fand.

3. Pentosenvergärung. Starke Vergärung von Arabinose und Rhamnose, seltener Xylose, wird nach Orla-Jensen und Henneberg (1) niemals durch Str. lactis bewirkt, diese Fähigkeit aber stets dem typischen Str. faecium zugeschrieben. Viele andere Forscher können (s. Zusammenstellung von Demeter (2)) auf Grund ihrer Untersuchungen diese Angaben für Str. lactis zum größten Teil bestätigen. Die Hauptursache der Nichtübereinstimmung der Literaturstellen sehen wir in der Vorzüchtung dadurch, daß das Pentosensäuerungsvermögen tatsächlich verlorengehen kann, und auch in der Auswahl der Nährmedien, mit denen die Säuerung nachgewiesen werden soll. Nach Seibel säuert Str. lactis im Gegensatz zu Str. faecium keine Arabinose, Rhamnose und Xylose. Die Gärbilder von Demeter (2) lassen die für Str. faecium (Enterokokken) charakteristische Eigenschaft der Pentosenvergärung nicht eindeutig erkennen. Die an anderen Stellen (z. B. Keitel) sich sehr häufig zeigenden Schwankungen bei Säuerung von Kohlehydraten konnte Stölting durch schonende Behandlung seiner Stämme ausschließen und in einem Zwischenzeitraum von 3—6 Monaten ein allgemein konstantes Gärbild erhalten, womit obige Vermutung der Hauptursache (die Verschiedenheit der Vorzüchtung) eine neue Stützung erhalten haben dürfte. Ebenso hält Wirth das Verhalten der Milchsäurestreptokokken zu den Kohlehydraten (Arabinose usw.) für typische und konstante Merkmale. Auch Demeter und Pfundt konnten die Konstanz der Vergärungsfähigkeit von Kohlehydraten für eine Anzahl von Milchsäurestreptokokken fäkaler Herkunft noch nach einer mehr als 8 Jahre dauernden Fortzüchtung in Milch nachweisen.

Vorschlag: Um zukünftige Verwirrungen zu vermeiden und ein einheitliches Vorgehen zu fördern wird für die Identifizierung des Str. lactis und Str. faecium folgendes vorgeschlagen: Für die Hitzeresistenzprüfung soll nur eine Erhitzung von 63° C ½ Std. lang (Dauerpasteurisierung) in Milch maßgebend sein. Als typisch für Str. lactis wird die Lackmusmilchreaktion nach Heim 1a bei 30 oder 37° C und für Str. faecium nach Heim 2a bei 37° C angesehen. Von einem typischen Str. faecium wird Pentosenvergärung (Arabinose oder Rhamnose) in Bouillon verlangt, während der typische Str. lactis Pentosen nicht oder nur sehr schwach säuern darf. Die Prüfungen sind, um die Fehler-

quelle der Vorzüchtung auszuschalten, möglichst bald nach der Isolierung vorzunehmen. Obige Merkmale dürfen nur zusammen gewertet werden.

Methoden.

1. Die Hitzeresistenzprüfung wurde vorgenommen nach der bekannten Kieler Ampullenmethode. Die beschickten und wieder zugeschmolzenen Ampullen tauchen hierbei ganz unter Wasser. Das Einhalten einer Temperatur von genau 63° C (geeichtes Thermometer) bereitet in einem genügend großen Wasserbade keine Schwierigkeiten. Durch einen Vorversuch wurde die Zeitspanne ermittelt, die nötig ist, um alle Milchteile in der Ampulle auf Wassertemperatur (63° C) zu bringen. Diese Zeit (55 Sek.) brachten wir bei den Versuchen selbst in Abzug, so daß für die Dauererhitzung genau ½ Std. eingehalten wurde. Die Ampullen wurden nach dem jeweiligen Erhitzen — uns interessierten auch 15, 20 und 25 Min. — sofort unter fließendem Wasser gekühlt und der Inhalt in Lackmus-Milchröhrchen entleert. Z. T. wurden auch von der erhitzten und wieder gekühlten Milch Petrischalenkulturen mit Chinablau-Milchzucker-Bouillonagar angelegt und bei 37° C bebrütet.

2. Für die Lackmusmilchprobe kam 3 mal im Dampftopf fraktioniert sterilisierte Magermilch zur Verwendung, die mit 10% steriler Lackmustinktur (Merck) versetzt wurde. Wir nahmen 10% an Stelle der sonst üblichen 7%, weil diese die Milch nicht blau, sondern leicht lila färbte und zu Irrtümern Veranlassung geben konnte. Getrennt sterilisierten wir, um die sich bei der Sterilisation etwa bräunlich verfärbte Milch, die nach unseren Erfahrungen einen denkbar ungünstigen Nährboden darstellt, sofort ausschalten zu können. Die Lackmusmilch wurde ferner sicherheitshalber vor Gebrauch mindestens 2—3 Tage bei 37° C bebrütet.

3. Die Prüfung des Arabinose-Säuerungsvermögens wurde in vorher durch Bact. coli entzuckerter Bouillon mit einem 1proz. Arabinose- und 7proz. Lackmustinkturzusatz (Merck) vorgenommen. Wir wählten Bouillon, da sich durch frühere Versuche Hennebergs und Wendts (2) diese zur Vergärung als günstiger erwiesen hatte als Hefewasser. Sterilisiert wurde getrennt, die Bouillon im Autoklaven, die Arabinoselösung und die Lackmustinktur 3mal fraktioniert im Dampftopf. Eine 3tägige Bebrütung bei 37° C ging jeder Verwendung voraus.

Vorversuche und Herkunft der Stämme.

Die Lactisstämme der Kieler Reinkulturen-Versandabteilung wurden hinsichtlich der drei vorerwähnten Hauptmerkmale einer Prüfung unterzogen. Die Ergebnisse waren kurz folgende: kein Lactisstamm überdauerte auch nur 10 Min. eine Erhitzung von 63° C. Die Lackmusmilchreaktion fiel bei allen Stämmen nicht innerhalb 24 Std. bei 30 bzw. 37° C typisch aus, einige Stämme wiesen eine verzögert typische Reaktion auf. Diese Verzögerung kann in der langen Fortzüchtung in Maische mit Kreide begründet sein, die Stämme waren etwas geschwächt. Arabinose und Rhamnose wurde entweder gar nicht (68%) oder nur sehr schwach gesäuert, die zum Vergleich herangezogene Dextrose dagegen von allen kräftig. Es wurden 7 Stämme (1—7) ausgewählt, die, um allen Anforderungen gerecht zu werden, sowohl bei 30 als auch bei 37° C innerhalb 24 Std. eine typische Lackmusmilchreaktion zeigten. St. 1, 2, 4 u. 5 säuerten keine Arabinose, St. 3, 6 u. 7 sehr schwach.

St. 1 u. 2 waren aus Rohmilch isoliert, St. 3 aus sauerem Rahm, Lactis 4, 5, 6 u. 7 aus Butter, die bei St. 5 kein Aroma aufwies (fade), und bei St. 6 malzig schmeckte.

Die Federstrichkulturen in Milchzuckerbouillon zeigten die typischen „Güntheri"-Formen (zugespitzt) neben kürzeren Ketten mit eiförmigen Zellen. Das Wachstum in Milchzuckerbouillon war bei 30 und 37° C gut mit anfänglich starker diffuser Trübung, die später schwächer wurde, und sehr starkem Bodensatz. Gasbildung in der koagulierten Magermilchkultur wurde nie beobachtet.

Zur Feststellung der Optimaltemperatur für das Säuerungsvermögen der Ausgangs-Lactisstämme wurden die bei 30 bzw. 37° C gehaltenen Magermilchkulturen titriert (s. Tab. 1).

Tabelle 1 (titriert mit n/4 NaOH, Indikator Phenolphthalein).

Stamm	S. H. bei 30° C			S. H. bei 37° C		
	24 Std.	48 Std.	5 Tage	24 Std.	48 Std.	5 Tage
1	26,0	29,0	43,5	28,5	35,0	39,0
2	25,8	27,0	40,5	29,0	31,5	35,5
3	26,5	29,0	42,0	26,7	31,5	37,0
4	28,6	29,6	41,5	30,4	35,0	40,5
5	30,5	33,5	40,0	28,7	33,0	40,75
6	25,0	28,3	38,0	26,8	29,5	34,75
7	28,8	31,0	41,0	30,0	32,5	39,75

Wie aus der Tabelle hervorgeht, säuerten alle Stämme — mit Ausnahme von Lactis 5 — bei 37° C nach 24 und 48 Std. z. T. erheblich stärker als bei 30° C. Das absolute Säuerungsvermögen war jedoch letzthin bei 30° C größer, wieder mit Ausnahme von St. 5, der bei 30 und 37° C sowohl nach 48 Std. als auch nach 5 Tagen ungefähr gleich stark säuerte. Die gebildete Säuremenge — in Prozenten umgerechnet — reicht zur Koagulation bei beiden Temperaturen nach 24 Std. aus, da nach Weigmann für die Koagulation von Milch durch Säure bei 30° C — 0,50% und bei 40° C — 0,25% nötig sein soll; Demeter (2) gibt nach seinen Befunden für 30° C — 0,50% bzw. 0,424 (0,43) % und für 37° C — 0,43% bzw. 0,405 (0,41) % an, bei einer Originalacidität der Milch von 0,415 bzw. 0,16%.

Auffallend war das Verhalten des zum Vergleich herangezogenen Str. faecium, der von Sach vor längerer Zeit (ca. 2 Jahren) aus dem Stuhl einer erwachsenen Person isoliert worden war und alle 3—4 Monate in Maische mit Kreide zur Weiterzüchtung übergeimpft wurde. Das Wachstum und Aussehen in Milchzuckerbouillon und in der Federstrichkultur war normal. Die absolute Säuerung in Magermilch war bei 30° C (33,0 S. H.) stärker als bei 37° C (29,0 S. H.), während das anfängliche Säuerungsvermögen bei 37° C (20,5 S. H. gegen 17,8 S. H. bei 30° nach 24 Std.) größer war. Dementsprechend wurde die Milch erst nach 24 Std. koaguliert; Gasbildung trat nicht auf. Die Lackmusmilchprobe zeigte verzögert die für Str. lactis typische Reaktion, war demnach für Str. faecium atypisch (s. u.). Auch die Fähigkeit der Pentosensäuerung war verlorengegangen. Dieser Stamm, der gleich nach der Isolierung hitzeresistent gewesen war, wuchs nicht mehr bei 45° C und überstand bei unseren Versuchen die Dauerpasteurisierung (63° C — 30 Min.) ebenfalls nicht, er hielt nur 15 Min. 63° C aus und überlebte 20 Min. nicht mehr. Vorweg und für diesen Faecium-Stamm abschließend sei erwähnt, daß die Hitzeresistenz durch vier Passagen sowohl in Milch mit Kreide als auch in Maische und Roggenschrotabkochung mit Kreide bei 37° C wieder angezüchtet werden konnte. Da jedoch auch nach 7 Passagen, trotz konstanter Hitzeresistenz, Arabinose und Rhamnose nicht gesäuert wurden, auch die Lackmusmilchreaktion atypisch (für Str. lactis verzögert typisch) blieb, wurde das Verhalten leider nicht weiter verfolgt, auch unterblieb, wie später bei allen anderen Stämmen, die Prüfung der Wachstumsfähigkeit bei 45° C.

Hauptversuche.

Für die Hauptversuche wurden Milchsäurestreptokokken (Str. lactis) ausgewählt (s. o.), die hinsichtlich der drei Hauptmerkmale folgende Eigenschaften aufwiesen: 1. nicht-hitzeresistent, 2. typische Lackmusmilchreaktion, d. h. Koagulation der Milch und gleichzeitige Reduktion des Farbstoffes zur Leukobase mit anschließender Reoxydation (gekennzeichnet durch einen nunmehr im Sauren liegenden roten Ring) von oben innerhalb 24 Std., 3. fehlendes oder schwaches Arabinosesäuerungsvermögen.

1. Umwandlungsversuche mit Hilfe der Hitzeresistenz-Anzüchtung durch Gewöhnung an höhere Temperaturen.

Der erste Versuch der Hitzeresistenz-Anzüchtung durch Gewöhnung an höhere Temperaturen entsprach nicht den Erwartungen. Es gelang niemals durch verschieden lange oder mehrmalig wechselnde kürzere (4 Std.) und längere Bebrütung (3 Tage) bei 45 und 37° C Lactis-Kulturen in Milch, Milch mit Pepton, Maische, Maische mit Pepton oder Roggenschrotabkochung, die während 8, 12 oder 24 Std., 2 und mehr Tagen bei 37° C gut angewachsen waren (gegen stärkere Schädigung durch sich bildende Milchsäure wurde ein Kreidezusatz gegeben) hitzeresistent zu machen. Keine dieser vielen Kulturen überstand 63° C auch nur 15 Min., ebenso konnte durch Titration keine Vermehrung der Säuremenge der bei 45° C verschieden lang und bei 37 und 45° C wechselnd bebrüteten Kulturen bei einer Bebrütung von 45° C festgestellt werden; auch wurde 45° C selten länger als 24 Std. überdauert.

2. Umwandlungsversuche durch Passagen in Milch, Milch mit Pepton, Maische, Maische mit Pepton und Roggenschrotabkochung.

Ausgehend von der Hitzeresistenz-Anzüchtung für Bact. coli wurde bei den Passagen für Str. lactis I. Magermilch, II. Magermilch mit Pepton, III. Maische, IV. Maische mit Pepton und V. Roggenschrotabkochung verwendet. (Milch II und Maische IV mit gewöhnlichem Peptonwasser im Verhältnis 1 : 1.)

Die erste Beimpfung der einzelnen Nährmedien mit den einzelnen Lactisstämmen (1—7) wurde am 16. 11. 35 vorgenommen und bei 37° C bebrütet, die 2. Passage am 18., die 3. am 23., die 4. am 28. 11., die 5. am 2. 12., die 6. am 5. 12. und die 7. am 17. 12. 35.

Da bei der Coli-Hitzeresistenz-Anzüchtung die ersten drei Passagen keine Veränderungen hervorgerufen hatten, wurde bei unseren Versuchen erst die 5. Passage (Methode wie bei Coli) nach 2 tägiger Bebrütung geprüft. Die Zusammenstellung der Ergebnisse finden sich in Tab. 2.

Erklärung der Tabellen: In den Tabellen sind alle Ergebnisse gesammelt aufgeführt. Die einzelnen Zahlen in den „Erhitzungsspalten" drücken die Art der Lackmusmilchreaktion aus, die wir in Anlehnung an Heim — ohne seiner sich aus den jeweiligen Reaktionen ergebenden Charakterisierung zu folgen — folgendermaßen numeriert haben:

1 = die Lackmusmilch wird innerhalb 24 Std. weiß und gerinnt nach erfolgter Reduktion. Zugleich tritt von oben Reoxydation (Rötung) ein, die in den folgenden Tagen nach unten fortschreitet (Heim 1 a).

Str. lactis — typisch.

2 = Reaktion 1 tritt verzögert erst nach ein oder mehreren Tagen auf (Heim 1 b).

Verzögert Str. lactis — typisch.

3 = die Lackmusmilch wird nur reduziert, ohne Koagulation (Heim 1 b).

Atypisch.

4 = die Lackmusmilch wird gerötet und gerinnt ganz oder teilweise mit nachfolgender Reduktion von unten (Heim 2 a).

Str. faecium — typisch, nach Demeter lactis — pseudotypisch.

5 = die Lackmusmilch wird leicht gerötet und gerinnt nie oder höchstens in der Kuppe und wird auch nur in der Kuppe reduziert (Heim 2 b).

Atypisch.

6 = die Lackmusmilch wird nie reduziert. Sie wird bald stärker, bald schwächer rot und gerinnt (Heim 3 a).

Atypisch.

7 = die Lackmusmilch wird bald stärker, bald schwächer rot, die Gerinnung setzt sehr verspätet (v.) ein, wird nicht vollständig oder bleibt aus (fl.).

(Heim 3 b) Atypisch.

Atypisch = für Str. lactis und Str. faecium anormal.

Zum schnelleren Verständnis ein Beispiel aus der Tab. 2: Lactis Nr. 1 III = Lactis-Stamm 1 in Maische mit Kreide hielt nicht 15 und 25 Min. bei 63° C aus, wohl aber 20 und 30 Min. Die Lackmusmilchreaktion war beidemale = 2, d. h. verzögert lactis — typisch.

Die Lackmusmilchproben wurden bei 37° C bebrütet und täglich beobachtet, um jegliche Irrtümer — ob lactis- oder verzögert lactis- oder faecium-typisch — auszuschalten.

4. 12. Tabelle 2. v. = verspätet

Lactis Nr.	I 63°				II 63°				III 63°				IV 63°				V 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	2	1	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	1	1	—	—	—	—	6	—	2	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
3	7 v.	7 v.	7 v.	7 v.	1	7 v.	7 v.	7 v.	7 v.	1	2	2	5	5	—	5	5	5	5	1
4	—	2	—	2	—	—	—	—	—	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	1	2	1	—	—	—	—	7 v.	—	2	—	—	—	—	—	1	5	5	—
6	—	2	—	—	1	—	—	—	7 v.	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—
7	7 v.	1	—	2	—	—	—	—	7 v.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Die Ergebnisse von Milch mit Kreide (I) konnten nicht gewertet werden, da die Milch bei der Erhitzung z. T. geronnen war; nur der Vollständigkeit halber sind sie in der Tabelle eingetragen.

Schon diese Tabelle zeigt, wie zeitlich schwankend die Resistenz der einzelnen Stämme gegen eine Erhitzung auf 63° C durch Passagen in den einzelnen Nährmedien war. Lactis 1 z. B. überstand die Erhitzung nur in den Passagen mit Maische nach 20 und 30 Min., sonderbarerweise nach 15 und 25 Min. nicht. St. 3 war in allen Medien hitzeresistent, hielt aber in Maische mit Pepton 25 Min. nicht aus. Bei St. 4—7 war ebenfalls die Resistenz stark schwankend. Hitzeresistent waren im Medium II = 2 Stämme (28%), III = 3 St. (43%), IV = 1 St. (14%) und V = 1 St. (14%).

Ebenso verschieden war die Lackmusmilchreaktion, die in dieser Tabelle gleich 5 Variationen aufweist, von denen einige noch lactis-typisch oder verzögert lactis-typisch waren, die anderen dagegen atypisch. Es kann für diese Erscheinungen weder eine Gesetzmäßigkeit festgestellt noch eine Begründung gegeben werden. Kein Stamm reagierte faecium-typisch.

Ein ganz anderes Bild ergibt sich hinsichtlich der Lackmusmilchreaktion aus der Tab. 3 (6. Passage). Die hitzeresistenten Kulturen — mit einer Ausnahme — und auch fast alle anderen die Erhitzung kürzere Zeit überlebenden Kulturen reagierten in der Lackmusmilch faecium-typisch; nur 3 Kulturen waren nach einer Erhitzungsdauer von 15 bzw. 20 Min. lactis-typisch geblieben. In I überdauerten 14% die Erhitzung von 63° C während 30 Min., in II — 86%, in III und IV — 14% und in V — 43%. Hatten sich schon die Prozentwerte für die einzelnen Medien teils zur positiven teils zur negativen Seite hin verschoben, so war es auffallend, daß Kulturen, die sich in der 5. Passage als hitzeresistent erwiesen hatten, diese Eigenschaft in der 6. Passage nicht mehr aufwiesen und umgekehrt andere Kulturen, die vorher nicht hitzeresistent waren, nun plötzlich die Dauererhitzung überstanden. Der St. 3, der schon bei der 5. Passage 63° C 30 Min. überlebte, überdauerte auch bei der 6. Passage konstant die Erhitzung mit typischer Faecium-Lackmusmilchreaktion. Für ihn scheint also die Umwandlung in Str. faecium restlos gelungen zu sein.

6. 12. Tabelle 3.

Lactis-Nr.	I 63°				II 63°				III 63°				IV 63°				V 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—
2	—	—	4	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—	4	—	—	4	4	4	4
3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
4	—	—	—	—	—	—	—	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	4	—	1	—	—	—	—	6	—	4	4	4	4
6	—	1	—	—	—	—	—	6	1	—	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	4	—	4	4	—	—

Die Frage lautete nun: Sind diese Eigenschaften konstant oder nicht? Die Nachprüfung in einer 7. Passage sollte hierauf die Antwort geben (s. Tab. 4).

19. 12. Tabelle 4.

v. = verspätet; Inf. = Infektion. Lackmusmilch konnte vorher nicht auf Sterilität geprüft werden.

Lactis Nr.	I Bodensatz 63°				II Bodensatz 63°				III 63°				IV 63°				V 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	—	—	—	—	—	—	—	—	Inf. (—)	7 v.	—	4	Inf. (—)	6	Inf.	Inf.	Inf. (—)	4	4	7 v.
2	—	—	—	—	7 v.	—	7 v.	6	Inf. (+)	Inf.	—	Inf.	Inf. (—)	7 v.	—	7 v.	6 (—)	4	4	7 v.
3	—	—	7 v.	—	—	6	7 v.	7 v.	6 (+)	6	7 v.	7 v.	7 v. (+)	7 v.	7 v.	7 v.	6 (+)	6	Inf.	7 v.
4	—	—	—	7 v.	—	—	—	—	Inf. (—)	6	4	3	— (—)	—	7 v.	7 v.	6 (—)	6	7 v.	4
5	—	—	—	7 v.	7 v.	7 v.	—	—	Inf. (+)	—	7 v.	—	Inf. (—)	3	7 v.	—	6 (—)	7 v.	7 v.	7 v.
6	—	—	—	—	7 v.	—	—	—	6 (—)	—	7 v.	7 v.	6 (—)	6	7 v.	Inf.	6 (—)	Inf.	—	Inf.
7	—	—	—	—	—	—	—	—	6 (+)	4	Inf.	7 v.	Inf. (+)	Inf.	6	Inf.	6 (+)	4	4	4

(+): Arabinosesäuerung vorhanden. (—): Arabinosesäuerung nicht vorhanden.

Betrachtet man die Ergebnisse der Erhitzung und der Lackmusmilchreaktion in der Tab. 4, so kann man für die Nährmedien III, IV und V neben einer Konstanz sogar eine Zunahme der Hitzeresistenz feststellen, dagegen jedoch vor allem bei II eine starke Abnahme. Eine Entnahme des Prüfungsmaterials für I und II aus der Kreideschicht zeitigte dieselben Ergebnisse. Fast keine Probe reagierte in der Lackmusmilch in der gleichen Weise wie bei der 6. Passage. Wenn man demnach von einer gewissen Konstanz für die Erhitzung sprechen kann, trifft diese Konstanz keineswegs auch für die Lackmusmilchreaktionen zu. Wie ferner aus der Tabelle zu ersehen ist, hatte sich das Arabinosesäuerungsvermögen gewandelt. St. 2, der in der Ausgangskultur nicht säuerte, hat diese Fähigkeit in der 7. Passage wohl in Maische, nicht aber in Roggenschrotabkochung gewonnen. St. 3 säuerte in III, IV und V stark, in der Ausgangskultur war die Säuerung nur schwach. St. 6 hat das Säuerungsvermögen ganz verloren, St. 7 dagegen vergrößert. Also ist auch bei der Arabinosesäuerung Variabilität festzustellen.

Fassen wir die Ergebnisse aus diesen Umzüchtungsversuchen zusammen, so scheint die Möglichkeit gegeben, aus einem Str. lactis durch gewisse Passagen in verschiedenen Nährmedien einen typischen Str. faecium zu gewinnen (Tab. 3). Als konstant gelungen kann die Hitzeresistenz-Anzüchtung für St. 3 in allen Nährmedien angesehen werden. Die besten Erfolge für alle Stämme wurden in Maische und Roggenschrotabkochung mit Kreide erzielt. Die Lackmusmilchreaktionen sind, abgesehen von ihren außerordentlichen Schwankungen, vielleicht insofern bemerkenswert, als nach 6 Passagen nur noch 3 erhitzte Kulturen das für Str. lactis typische Bild ergaben und nach 7 Passagen gar keine mehr. Die Säuerungsfähigkeit in Arabinose verstärkte sich bei St. 3 und 7 in den untersuchten Medien; bei St. 2 und 5 wurde diese Fähigkeit nur in Maische erworben, seltsamerweise nicht in Maische mit Pepton und Roggenschrotabkochung. Während St. 6 gar nicht mehr säuerte, blieb es bei St. 1 und 4 bei dem ursprünglichen Unvermögen.

Die sich bei den einzelnen Passagen und Erhitzungen ergebenden Reaktionen in Lackmusmilch und Arabinose auf Analogien anderer Streptokokken zu beziehen bzw. die erhaltenen Ergebnisse zur Identifizierung zu verwenden, würde nur verwirren und wird deshalb davon Abstand genommen.

Die Versuche mußten hier unterbrochen werden und konnten erst Ende Januar 1936 wieder aufgenommen werden.

In alkalischer Galle-Maische.

Nachdem durch einen Vorversuch festgestellt worden war, daß Str. lactis sich in alkalischer Maische mit Kreide und einem 10 proz. Gallezusatz gut entwickelte (die Maische wurde mit NaOH alkalisiert), wurden sowohl die Ausgangsstämme als auch Material von der 7. Passage der 5 Nährmedien in solche Galle-Maische geimpft und bei 37° C bebrütet. Diese alkalische Maische sollte eine Annäherung an die Darmverhältnisse (s. u.) sein. St. 3, der sich als konstant hitzeresistent erwiesen hatte, wurde von den weiteren Versuchen ausgeschlossen. Die 2. Passage wurde einer Erhitzung von 63° C unterworfen, die Ergebnisse sind in der Tab. 5 zusammengestellt.

Die Hitzeresistenz der Ausgangsstämme nach 2 Passagen ist wider Erwarten groß. Drei Stämme überstanden die Dauerpasteurisierung, St. 5 mit typischer Faecium-Lackmusmilchreaktion. St. 1, 6 und 7 überdauerten nur 25 Min., waren also nicht hitzeresistent. Aus dem Nährmedium I über-

31. 1. 36. Tabelle 5. fl. = flüssig; v. = verspätet.

Lactis Nr.	Ausgangsstämme 63°				I 63°				II 63°				III 63°				IV 63°				V 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	—	—	7 fl.	—	—	6 +	—	—	—	—	—	3	—	—	7 v.	—	4 —	—	—	—	—	—	6	—
2	—	—	—	7 fl.	—	—	—	—	—	6 +	—	—	4 +	4 +	6 +	6 +	—	—	4	—	6 +	6 +	6 +	6 +
4	—	4 +	—	7 v.	—	—	6 +	—	—	—	—	—	4	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	4	—	—	—	—	—	3	—	—	—	4 +	—	6 +	4	7 v. +	—	—	6 +	4 +	7 v.	7 v. +
6	—	—	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4 +	6	7 fl. —	4 +	3	6 +	7 v. +	6 +	—	—	—	—
7	—	3 +	7 fl.	—	4 +	—	—	—	7 fl.	—	—	—	—	4 —	4 +	6	6 +	6	6 +	6	6 +	4 +	7 v. +	7 v. +

dauerte kein Stamm und aus II lediglich eine Kultur die Dauererhitzung. Die Hitzeresistenz aus III schwankte und hatte aus IV und V merklich nachgelassen. Ebenso inkonstant zeigte sich die Lackmusmilchreaktion für die einzelnen Stämme aus den verschiedenen Nährmedien. Für die Prüfung des Arabinosesäuerungsvermögens wurde, wie bei der 7. Passage, nicht die jeweilige Ausgangskultur benutzt, sondern Material aus der veränderten Lackmusmilch verwendet. Alle untersuchten hitzeresistenten Kulturen säuerten die Arabinose und auch zum größten Teil diejenigen, die weniger als 30 Min. 63° C überstanden hatten.

Um auch die Frage der Konstanz zu klären, wurden nach drei Wochen erneut Hitzeresistenzprüfungen vorgenommen, analog den Prüfungen für das Arabinosesäuerungsvermögen auch hier mit den bei Zimmertemperatur gehaltenen Lackmusmilchkulturen selbst, die eine Erhitzung von 63° C während 15, 20, 25 bzw. 30 Min. überdauert hatten. Neben der Kontrolle in Lackmusmilch und Arabinose prüften wir auch das Wachstum auf Chinablau-Milchzuckerbouillonagar in Petrischalen.

Als Impfmenge für die Petrischalenkulturen wurde etwa 1 ccm der erhitzten und wieder gekühlten Milch verwendet, so daß eine einigermaßen quantitative Unterscheidung des Wachstums, ob 1—2 Keime (+), schwach +, stark ++ oder sehr stark +++, möglich war. In der Tab. 6, in der alle Ergebnisse zusammengefaßt sind, bedeutet L = Lackmusmilchreaktion, P = Wachstum auf Chinablau-Milchzucker-Bouillonagar der Petrischalenkulturen. Die Arabinosesäuerung, die ebenfalls wieder von den erhitzten Kulturen selbst geprüft wurde, ist in dieser Tabelle neben die Zahlen der Lackmusmilchproben gesetzt und es bedeutet (+) = Säuerung vorhanden, (—) = nicht vorhanden. Zur besseren Orientierung wurde in der „Kulturenspalte" die Arabinosesäuerungsfähigkeit (aus der Tab. 5 ersichtlich) mit denselben Zeichen wie oben unter die einzelnen Kulturbezeichnungen, die sich aus Stammnummer und überstandener Erhitzungszeit zusammensetzen (siehe Tab. 5), eingetragen.

Auffallend ist bei Betrachtung der Tab. 6, daß die vorher 20 bzw. 30 Min. 63° C aushaltenden Kulturen der Ausgangsstämme diese angezüchtete Eigenschaft in der Lackmusmilchprobe restlos verloren hatten. Dagegen konnten auf der Agarplatte bei St. 5, der vorher hitzeresistent gewesen war, lediglich bei einer Erhitzungsdauer von 25 Min. 2 Milchsäurestreptokokken-Kolonien festgestellt werden, ebenso bei St. 7, 20′ nur nach 15 Min. langer Erhitzung. Über die Kolonien selbst soll weiter unten Näheres gebracht werden. In der nächsten Gruppe (I) überstand St. 1, der zuvor

21. 2. 36. Tabelle 6. fl. = flüssig.

Kultur	63° 15′	20′	25′	30′	Kultur	63° 15′	20′	25′	30′
Ausgangs-					III				
stämme					7 20′	L. —	—	—	—
4 20′	L. —	—	—	—	—	P. —	—	—	—
+	P. —	—	—	—	7 25′	L. —	—	—	—
5 30′	L. —	—	—	—	+	P. —	—	—	(+)
	P. —	—	(+)	—	7 30′	L. —	—	—	4 +
7 20′	L. —	—	—	—		P. —	—	—	(+)
+	P. (+)	—	—	—					
I					IV				
1 20′	L. 4 —	4	4	4 +	1 15′	L. 4	7 fl.	7 fl.	—
+	P. +++	++	++	++	—	P. +	(+)	(+)	—
4 25′	L. —	—	—	—	2 25′	L. —	—	—	—
+	P. ++	++	++	+		P. (+)	(+)	—	—
7 15′	L. Inf.	Inf.	Inf.	Inf.	5 15′	L. 4 +	—	—	—
+	P. Inf.	Inf.	Inf.	Inf.		P. +	—	—	—
II					5 20′	L. —	—	—	—
1 30′	L. —	—	—	—	+	P. —	—	—	—
	P. —	—	—	—	6 20′	L. —	—	—	—
2 20′	L. 4	4	4	2	+	P. —	—	—	—
+	P. ++	++	++	++	6 25′	L. —	—	—	—
5 20′	L. —	—	—	—	+	P. —	—	—	—
	P. —	(+)	—	—	6 30′	L. 4	—	4 +	4
7 15′	L. 7 fl.	—	4 +	4	+	P. +	—	+	—
	P. —	—	—	—	7 15′	L. 4	4	—	—
III					+	P. +	—	—	—
2 15′	L. 4	4	4 +	4 +	7 25′	L. —	—	—	—
+	P. +++	—	+	—	+	P. —	—	—	—
2 20′	L. 7 fl.	—	—	—					
+	P. —	—	—	—	V				
2 25′	L. 4	4 +	4 +	4	2 15′	L. 4 +	4 +	4 +	4 +
+	P. +++	+	(+)	+	+	P. +++	+	+	(+)
2 30′	L. 4	4 —	4 +	7 fl.	2 20′	L. 4	4	4 +	4 +
+	P. ++	+	(+)	—	+	P. +++	+++	+++	++
4 15′	L. —	—	—	—	2 25′	L. 7 fl.	7 fl.	7 fl.	4 —
	P. —	—	—	—	+	P. (+)	+	—	—
4 25′	L. —	—	—	—	2 30′	L. 4	4	4 +	4 +
	P. —	—	—	—	+	P. +++	+++	++	+
5 20′	L. —	—	—	—	5 15′	L. 4	4	4 +	4 +
+	P. —	—	—	—	+	P. +++	+++	+++	++
5 30′	L. 4	4	4 +	Inf.	5 20′	L. 4	4	4 +	4 +
+	P. ++	++	+	Inf.	+	P. +++	++	+	—
6 15′	L. —	—	—	—	5 30′	L. 4	4 +	4 +	4
+	P. —	—	—	—	+	P. ++	++	(+)	—
6 20′	L. —	—	—	—	7 15′	L. 4	4	4 +	4 +
	P. —	—	+	—	+	P. +++	++	++	++
6 25′	L. 7 fl.	—	7 fl.	7 fl.	7 25′	L. 4	4	4 +	4 +
—	P. +	—	+	—	+	P. +++	+++	+++	++
6 30′	L. —	—	—	—	7 30′	L. 4	4	4 +	4 +
	P. —	—	—	—	+	P. +++	+++	++	+

nur 20 Min. aushielt, die Dauerpasteurisierung. Ebenfalls hatte sich einheitlich die Lackmusmilchreaktion geändert und war faecium-typisch geworden. Während das vorhandene Arabinosesäuerungsvermögen nach 30 Min. Erhitzungsdauer konstant blieb, ging es bei der Probe nach 15 Min. verloren. Das Wachstum auf den Platten ging nicht immer Hand in Hand

mit der Lackmusmilchprobe. Eigenartig war das unerklärliche Verhalten von I, St. 4, 25′. Während die Lackmusmilch unverändert blieb, war bei den Petrischalenkulturen sehr starkes Wachstum zu beobachten. Für die Gruppe II ist bemerkenswert, daß St. 1 und 5 jegliche Resistenz eingebußt hatten, St. 2 und 7 dagegen, obwohl zuvor nur 20 bzw. 15 Min. vertragend, die Dauerpasteurisierung überstanden. Während St. 2 in der Tab. 5 für die Lackmusmilchprobe die Kennziffer 6 erhielt, reagierte er bei der nochmaligen Erhitzung nach 15, 20 und 25 Min. (wie auch I, 1, 20′) faeciumtypisch und nach 30 Min. — verzögert lactis-typisch. St. 7, der vorher nach 15 Min. ebenfalls die Lackmusmilch rötete, ohne sie zum Gerinnen zu bringen, zeigte nach 25 und 30 Min. Erhitzungsdauer die typische Reaktion für Str. faecium. Die Plattenkulturen ließen in Umkehrung zu I, 4, 25′ kein Wachstum erkennen, während sie bei St. 2 den Lackmusmilchproben analog waren. Beim Überblicken der Gruppen der III und IV ist die geringe Konstanz der Resistenz fast aller Stämme bei den verschiedenen Erhitzungszeiten auffallend, ebenso die teilweise wechselnden Lackmusmilchreaktionen und die variierende Fähigkeit bzw. Unfähigkeit der Arabinosesäuerung. Bei der Gruppe V war das Verhalten sowohl bei der Erhitzung als auch mit einer Ausnahme bei der Arabinosesäuerung konstant. Die Lackmusmilchproben sind mit Ausnahme von 2, 25′ für 15, 20 und 25 Min. alle faeciumtypisch. Das Wachstum auf den Platten ging nicht immer mit demjenigen in der Lackmusmilch konform.

Abschließend zu diesen Versuchen muß wieder die große Variabilität bei der Erhitzung als auch bei der Lackmusmilchreaktion sowohl für die erste als auch für die zweite Erhitzung mit Ausnahme der Gruppe V hervorgehoben werden. Auch das Arabinosesäuerungsvermögen und das Wachstum auf den Platten in Vergleich mit dem in der Lackmusmilch war nicht immer einheitlich. Beim Vergleich der Tab. 5 und 6, und wie vorweg erwähnt auch 7 und 9, scheint die Annahme nicht ganz unberechtigt zu sein, daß alle Reaktionen, bei denen die Lackmusmilch gerötet wird und teils gerinnt, teils flüssig bleibt, Vorstufen zur typischen Faecium-Reaktion sind bzw. als unvollständige faecium-typische Reaktionen angesehen werden können. Veranlassung zu dieser Annahme gibt das gehäufte Auftreten der typischen Faecium-Reaktionen bei der 2. Erhitzung.

Sehr aufschlußreich war für uns das Kolonie-Wachstum bei den Petrischalenkulturen. Die aufliegenden Kolonien waren fast weiß und säuerten auch nach 4 Tagen bei 37° C den Milchzucker selbst bei größerer Ansammlung nicht. Die Tiefenkolonien waren sehr klein und färbten den Agar nur, wenn sie in größerer Menge zusammen waren. Die Färbung war hellblau und konnte von der starken tiefblauen Färbung des typischen Str. lactis, der außerdem größere Kolonien bildet und auch einzeln und aufliegend säuert, gut unterschieden werden. Lagen die kleinen Kolonien im Agar verstreuter, so konnten sie leicht übersehen werden, da der Agar nicht gebläut wurde. Die Säuerung, durch Blaufärbung des Agars sichtbar, trat nur bei sehr starkem Wachstum innerhalb 48 Std., sonst nach 2—4 Tagen auf. Die Magermilch mit den hellen Oberflächenkolonien beimpft, koagulierte z. T. erst nach 8—10 Tagen, manchmal gar nicht, während die Organismen der hellblauen Tiefenkolonien die Gerinnung in 2—5 Tagen bewirkten. Das mikroskopische Aussehen (Klatschpräparat) konnte nicht von dem des typischen Str. lactis oder faecium unterschieden werden. Wir haben es allem Anschein nach mit Formen zu tun, wie sie Henneberg

und Wendt (2) in pasteurisierter Milch fanden, die hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften untersucht und als Str. faecium diagnostifiziert wurden. Das Aussehen und Verhalten der Kolonien bzw. ihrer Organismen war nach unseren Beobachtungen in allen Fällen gleich; es konnten trotz der Verschiedenheit der Lackmusmilchreaktionen keine Unterschiede bzw. Analogien zu den Reaktionen gefunden werden. Es drängen sich unwillkürlich die Fragen auf: Um welche Streptokokken handelt es sich hier? Ist es Str. lactis oder nicht? Daß er es war, zeigen unsere Vorversuche, daß er es nicht mehr ist, geht aus den Tabellen hervor. Diese Fragen bedürfen trotz obiger Diagnose ausgedehnter Untersuchungen, die vor allem auch den Mediziner interessieren.

Umwandlungsversuche durch alkalisch gehaltene Milchkulturen.

Durch diese Versuche sollte festgestellt werden, wie sich Str. lactis und seine durch andere Passagen veränderten Formen in einem einige (4) Tage alkalisch gehaltenen Nährmedium verhielten. Zu diesem Zwecke wurden die Ausgangskulturen und sämtliche Kulturen aus der 2. Galle-Maische-Passage in Magermilch mit Kreide übergeimpft. Als Indikator wurde Lackmus gewählt. Diese Kulturen wurden tagsüber bei 37° C und nachts, da eine dauernde Beobachtung technisch unmöglich ist und einer zu starken Säuerung vorgebeugt werden sollte, bei Zimmertemperatur belassen. Ein häufiges Nachsehen am Tage war erforderlich. Die Säuerung

15. 2. 36. Tabelle 7. fl. = flussig; v. = verspatet.

Lactis Nr.	Ausgangsstamme 63°				Aus 2. Pass. Maische/Galle 63°				I 7. u. 2. Pass. Maische/Galle 63°				II wie I 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	—	—	—	—					—	4	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	2 —	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4 +++
4	—	—	—	—					—	—	—	—	—	—	—	—
5	1 —	—	—	7 fl. ++	—	—	—	3	—	—	4	—	—	—	—	—
6	7 fl.	—	—	—					—	4	—	—	4	—	—	—
7	4 +++	—	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	7 v.	—	—	—

Lactis Nr.	III wie I 63°				IV wie I 63°				V wie I 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	—	4	4	4 +++	4 +++	—	—	4 +++	7 v.	4 +	—	7 v.
2	4 ++	4 +++	4 ++	4 +++	—	—	4 +	—	4 ++	4 +++	4	4 +++
4	—	4 +++	—	—	—	—	—	—	4 +++	—	—	—
5	4 ++	—	—	—	—	—	—	—	4 +++	4 ++	4 +++	4 +++
6	—	—	—	—	—	—	4 +++	—	—	7 v.	—	—
7	—	s. Text ++	s. Text	—	—	—	—	—	4 +++	4 ++	4 +++	4 +++

Tabelle 7 a.

Lactis Nr.	Ausgangsstamme 63°				Aus 2. Pass. Maische mit Galle 63°				I 7. u. 2. Pass. Maische/Galle 63°				II wie I 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	—	—	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	(+)	—	(+)
2	—	—	—	—	—	(+)	—	—	+	—	+	—	—	—	—	(+)
4	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	++	—	+	—	(+)	+++	—	—	—	+	+	+	—	+	—	—
6	(+)	—	(+)	(+)	—	—	—	—	(+)	++	+	—	++	—	—	—
7	—	—	—	—	+++	—	(+)	(+)	—	+	—	+	—	+	—	—

Lactis Nr.	III wie I 63°				IV wie I 63°				V wie I 63°			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	25′	15′	20′	25′	30′
1	+	(+)	(+)	+	—	—	—	—	(+)	—	—	—
2	+++	+++	+++	+++	+	—	(+)	—	+++	+++	+++	+++
4	+	+	—	—	(+)	—	—	—	+	—	(+)	—
5	+++	(+)	(+)	—	—	(+)	—	+	+++	+++	+++	+++
6	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	(+)	—	—
7	—	++	++	—	—	—	—	+	+++	+++	+++	+++

wurde stets durch Kreidezugabe neutralisiert und die Nährflüssigkeit durch Zugabe von NaOH alkalisiert, so daß die Lackmusmilch nach jeder Behandlung einen ungefähren p_H-Wert von 8,4—8,7 aufwies. Am 5. Tage wurden die Kulturen in Milch gebracht und erhitzt (Tab. 7 u. 7a).

Die Ergebnisse entsprachen nicht unseren Erwartungen. Die Ausgangsstämme 1, 2 und 4 überstanden nicht einmal 15 Min. lang eine Erhitzung auf 63° C; St. 6 und 7 keine 20 Min. Wie bei allen Erhitzungen konnte auch hier wieder das unerklärliche „Springen" bei St. 5, der 15 und 30 Min., nicht aber 20 und 25 Min. aushielt, beobachtet werden. Die Resistenz der anderen Kulturen, mit Ausnahme der Gruppe V, hatte z. T. merklich abgenommen, z. T. sich verschoben.

Auffallend ist wieder das gehäufte Vorkommen der typischen Faecium-Reaktionen in der Lackmusmilch. In der Gruppe III war das Verhalten von St. 7 nach einer Erhitzungsdauer von 20 bzw. 25 Min. eigenartig und wurde sonst nie beobachtet. Nach 48 Std. war die nur wenig veränderte Lackmusmilch bei gleichzeitigem Auftreten eines roten Ringes an der Oberfläche koaguliert. Erst später trat von unten her ohne vorausgegangene Rötung langsam Reduktion ein, so daß die Lackmusmilchprobe nach 7 Tagen eine typische Lactis-Reaktion vortäuschte.

Das wieder von den die jeweilige Erhitzungsdauer überstehenden Kulturen geprüfte Arabinosesäuerungsvermögen ist in der Tab. 7 unter den analogen Kennzahlen der Lackmusmilchprobe eingetragen. Fast alle Kulturen säuerten Arabinose, die Kulturen mit der Typenbezeichnung 1 und 2 erwartungsgemäß nicht. Das Wachstum der Chinablau-Milchzuckerbouillonagar-Kulturen stimmte auch hier (7 a) nicht immer mit dem in der Lackmusmilch überein. Das morphologische Aussehen der Kolonien und Organismen sowie ihr physiologisches Verhalten entsprach dem zuvor beschriebenen.

Nach 10 Tagen wurde eine nochmalige Erhitzung der in der Tab. 7

aufgeführten 63° C mindestens 15 Min. aushaltenden Kulturen vorgenommen, um auch wieder das konstante Verhalten der Organismen zu prüfen. (Tab. 8.)

25. 2. 36. Tabelle 8.

Kultur	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′
Ausgangsstamme				
5 15′	—	—	—	—
—				
5 30′	6	3	—	3
+				
6 15′	—	—	—	—
7 15′	4	4	4 +	4 +
+				
2. Pass.				
2 20′	—	4 +	—	—
—				
5 30′	—	—	—	—
7 15′	—	4	—	—
I				
1 20′	4	—	—	—
5 25′	—	4 +	—	—
6 20′	—	—	—	—
II				
2 30′	—	—	4 +	—
+				
6 15′	—	4 +	—	4 +
III				
1 25′	—	—	4 +	4
1 30′	4	4	4 +	4
+				
2 15′	4	4	4 +	4 +
+				
2 20′	4	4	4 +	4 +
+				
2 25′	4	4	4 +	4 +
+				
2 30′	4	4	4 +	4 +
+				
4 20′	4	4	4 +	4 +
+				
5 15′	4	4	4 +	4 +
+				
7 20′	—	—	—	—
+				
7 25′	—	—	—	—

Kultur	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′
IV				
1 15′	4	4	4 +	4 +
+				
1 30′	4	—	4 +	4 +
+				
2 25′	Inf.	Inf.	Inf.	Inf.
+				
6 25′	4	4	4 +	4 +
+				
V				
1 15′	Inf.	Inf.	Inf.	Inf.
1 20′	4	4	4 +	4 +
+				
2 15′	4	4	4 +	4 +
+				
2 20′	4	4	4 +	4 +
+				
2 25′	4	4	4 +	4 +
+				
2 30′	4	4	4 +	4 +
+				
4 15′	4	4	4 +	4 +
+				
5 15′	4	4	4	4 +
+				
5 20′	4	4	4 +	4 +
+				
5 25′	4	4	4 +	4 +
+				
5 30′	4	4	4 +	4 +
+				
7 15′	4	4	4 +	4 +
+				
7 20′	4	4	4 +	4 +
+				
7 25′	4	4	4 +	4 +
+				
7 30′	4	4	4 +	4 +
+				

Alle Kulturen der Gruppen III, IV und V, die nach der ersten Erhitzung in Lackmusmilch typische Faecium-Reaktionen bewirkten, überstanden die Dauerpasteurisierung, selbst wenn sie vorher nur 15, 20 oder 25 Min. ausgehalten hatten. Die Lackmusmilchreaktionen und das Arabinosesäuerungsvermögen erwiesen sich konstant typisch für Str. faecium. Für diese Gruppen wäre demnach eindeutig der Beweis erbracht, daß die angezüchteten Eigenschaften sich konstant verhalten. Die Organismen des Lactisstammes 7, die in der Gruppe III das eigenartige Verhalten in Lackmusmilch zeigten, überstanden eine zweite Erhitzung nicht mehr. In den übrigen Gruppen traten die oftmals beobachteten Schwankungen bei der Erhitzung und z. T.

auch bei der Lackmusmilchreaktion wieder auf. Bemerkenswert erscheint, daß die Kulturen, die die Lackmusmilch faecium-typisch veränderten, auch ausnahmslos die Arabinose säuerten.

Zusammenfassend kann für diese Versuche hervorgehoben werden, daß die größte Konstanz in der Roggenschrotabkochung, Maische und Maische mit Pepton erzielt werden konnte. Kulturen, deren Reaktionen in der Lackmusmilch und der Arabinose sich als faecium-typisch erwiesen, behielten diese Eigenschaft auch bei. Für den Ausgangsstamm 7 scheint eine Umwandlung in alkalisch gehaltener Lackmusmilch gelungen zu sein, da die zweite Dauerpasteurisierung mit typischer Reaktion in Arabinose und Lackmusmilch überstanden wurde.

Umwandlungsversuche in Maische mit Enzymen.

Diesen Versuchen lag die eingangs erwähnte Erwägung der Verdauungsbeeinflussung zugrunde.

Die Verdauung zerfällt bekanntlich in drei Hauptphasen: der Mund-, Magen- und Darmverdauung. Sie wird eingeleitet im Munde mit dem Einspeicheln der Nahrung. Der Speichel, eine farblose, oft trübe, fadenziehende Flüssigkeit von meist schwach alkalischer Reaktion enthalt ein diastatisches Enzym, das Ptyalin (Speicheldiastase) und ein den Malzzucker spaltendes Ezym, die Maltase. Ptyalin ist bei alkalischer oder besser neutraler Reaktion wirksam, saure Reaktion zerstört es. Die Wirkung kann jedoch andauern, wenn die saure Reaktion durch Milchsäure hervorgerufen wird. Schon im Munde beginnt der Abbau von Stärke und hochmolekularem Zucker. Die Nahrung, durch die Speiseröhre weiterbefördert, gelangt dann in den Magen. Der Magensaft, das Sekret der Magendrüsen, eine wasserklare Flüssigkeit, enthält ungefähr 0,1—0,4% HCl, Pepsin und Lab. Das Pepsin, als akzessorischer Stoff für die Salzsäure, die nach Disselhorst auch allein Eiweiß sehr langsam spalten kann, spaltet Proteine nur in Albumosen und Peptone, die vom Körper nicht aufgenommen werden können. Pepsin wirkt nur bei Anwesenheit von freier Salzsäure, in alkalischer Lösung geht es zugrunde. Lab bewirkt die Gerinnung der Milch durch Umwandlung des Kaseins in Parakasein und einer Albumose. Beim Verlassen des Magens wird der saure Nahrungsbrei mit dem durch Natriumkarbonat stark alkalisch reagierenden, farblosen und zähen Saft der Bauchspeicheldrüse überschwemmt und alkalisiert. Hier greift neben zuckerspaltenden Enzymen das eiweißspaltende Trypsin (durch die Enterokinase aktiviert) an, das die Proteine direkt bis zu den vom Körper absorbierbaren Aminosäuren abzubauen vermag. Die Wirksamkeit des Trypsins wird durch schwach saure Reaktion gehemmt und durch 0,1—0,3% Salzsäure ganz aufgehoben, durch niedrigen Sodazusatz (bis 0,3%) dagegen gefördert. Ferner enthält der Darmsaft Erepsin, das die durch Pepsin zerlegten Eiweißstoffe (Peptone und Albumosen) weiter zu Aminosäuren spaltet. Steapsin und Lipase, ebenfalls im Darmsaft enthaltene akzessorische Stoffe, spalten die Fette in Glyzerin und freie Fettsäuren. Die Galle, die als Produkt der Anhangsdrüse (Leber) ebenfalls gleich am Magenausgang in den Darm eintritt, fördert sowohl die Eiweiß- als auch die Fettspaltung.

Analog den Verdauungsverhältnissen führten wir unsere Versuche folgendermaßen aus: Die neutralisierte Maische ohne Kreidezusatz wurde mit den Ausgangsstämmen beimpft und bei 37° C bebrütet. Nach 8 Std. wurde ihr 0,2% Diastase und Maltase zugesetzt und weitere 4 Std. bebrütet (Mundverdauung). Da durch einen Vorversuch festgestellt worden war, daß Str. lactis in einer 0,3% Salzsäure enthaltenden Maische sich nicht entwickelte, z. T. sogar geschädigt wurde, setzten wir den 12 Std. alten Kulturen 0,2% Salzsäure und je 0,1% Pepsin und Lab zu (Magenverdauung). Nach weiteren 12 Std. (insgesamt 24 Std.) neutralisierten wir die Kulturen mit Kreide. Nach einem Zusatz von je 0,1% Trypsin und Erepsin, sowie von 10% Galle, wurde so viel Sodalösung hinzugefügt, bis sich ein p_H-Wert von ungefähr 9,0 ergab. Durch einen Vorversuch (s. o.) war festgestellt worden, daß Str. lactis in Maische bei einem Zusatz von 10% Galle, der ungefähr

10. 2. 36. Tabelle 9. fl. = flussig; v. = verspätet.

Lactis-Nr.	Lactis 63⁰				Lactis u. Coli 63⁰				8 Pass. Maische 63⁰				8 Pass. Roggenschr. 63⁰				am 23. 2. nochmals erhitzt: 8 Pass. Maische 63⁰				am 23. 2. nochmals erhitzt: 8 Pass. Roggenschr. 63⁰			
	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′	15′	20′	25′	30′
1	7 v.	—	7 v.	—	7 v.	—	—	—	4	4	4	4 +	4	4	4	6 +	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +
2	—	7 v.	7 v.	7 fl.	—	7 v.	—	7 v.	4	4	4	4 +	6	6	6	6 +	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +
4	7 v.	7 v.	7 v.	7 fl.	—	—	7 v.	—	4	4	4	4 +	7 v.	7 v.	7 v. +	—	4	4	4	4 +	4	4	4 +	—
5	7 v.	—	—	—	4	2	7 v.	7 v.	4	4	4	4 +	6	6	6	6 +	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +
6	—	—	—	7 v.	—	2	4	—	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +
7	7 v.	7 v.	7 v.	7 v.	4	4	7 v.	7 v.	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +	4	4	4	4 +

den natürlichen Verhältnissen entspricht (der Mensch sondert täglich ca. 1 l Galle ab), in seiner Entwicklung nicht geschädigt wurde (Darmverdauung). Auf ein fettspaltendes Enzym glaubten wir für Str. lactis verzichten zu dürfen. Die Kulturen wurden wieder 12 Std. (insgesamt 36 Std.) bei 37⁰ C bebrütet und dann in Milch geimpft und nach weiteren 12 Std. — bei Zimmertemperatur gehalten — der Erhitzung unterworfen. Die Ergebnisse sind in den Tab. 9—12 zusammengefaßt.

Den Untersuchungen mit den Lactis-Stämmen schlossen wir stets solche der Ausgangsstämme mit einem nicht-hitzeresistenten Bact. coli-Stamm an. Die ersten Versuche wurden am 8. Feb. 1936 angesetzt. Hinzugenommen wurden hier noch die Kulturen der 7. Passage in Maische und Roggenschrotabkochung (Tab. 4).

Wie aus der Tab. 9 ersichtlich, hatten die St. 2, 4, 6 und 7 die Dauerpasteurisierung überstanden, St. 1—15 und 25 Min., St. 5 nur 15 Min. lang 63⁰ C. Die Lackmusmilch wurde von allen Kulturen gerötet und z. T. koaguliert. Bei den Kulturen der Ausgangsstämme mit Bact. coli zusammen überstanden St. 2, 5 und 7 die Erhitzung auf 63⁰ C 30 Min. lang, St. 1 nur 15, St. 4—25 und St. 6—20 und 25 Min. lang. Auch hier konnte wieder das unerklärliche „Springen“ der Resistenz beobachtet werden. Die Lackmusmilchreaktionen waren nur für die Lactiskulturen und die thermoresistenten Lactis-Colikulturen einheitlich. Die Kulturen 5c, 6c und 7c bewirkten in der Lackmusmilch z. T. eine faecium- und 5c und 6c noch z. T. eine verzögerte lactis-typische Reaktion. Wider alles Erwarten günstig waren die Versuche mit Roggenschrotabkochung und vor allem mit Maische. In der Maische zeigten sich alle Kulturen als typisch für Str. faecium, auch in der Arabinosesäuerung. In Roggenschrotabkochung war die Umzüchtung nur für St. 6 und 7 einheitlich Str. faecium. St. 4 überdauerte die Pasteurisierung nicht und rötete nach 15, 20 und 25 Min. bei 63⁰ C die Lackmusmilch mit späterer Gerinnung, St. 2 und 5 mit Gerinnung innerhalb 24 Std. Arabionse wurde auch hier stets gesäuert. Eine nochmalige Erhitzung (am 23. 2.) erwies die Konstanz der Kulturen aus Maische und Roggenschrotabkochung hinsichtlich der Resistenz und der Arabinosesäuerung und für Maische auch der Lackmusmilchreaktion. Die Kulturen

in Roggenschrotabkochung reagierten nach der 2. Erhitzung ebenfalls alle faecium-typisch, obwohl sie vorher z. T. kein Reduktionsvermögen aufwiesen (s. auch Tab. 5 und 7).

Ziehen wir die Schlußfolgerung, so scheint eine Umwandlung des Str. lactis in Str. faecium durch verschiedene Passagen in Maische und Roggenschrotabkochung mit anschließender Behandlung analog der menschlichen Verdauung konstant gelungen zu sein.

Zur Untersuchung der Konstanz der Auswirkungen einer Enzymbehandlung für Str. lactis und Str. lactis mit Bact. coli wurden am 26. 2. und 1. 3. Versuche obiger Anordnung nochmals angesetzt und die Kulturen jeweils nach 48 Std. erhitzt. Eine zweite Erhitzung erfolgte nach 7 Tagen.

Tabelle 10.

Lactis	28. 2. Arabinose	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′	4. 3. Arabinose	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′
1	—	—	—	—	—	+	—	3	—	—
2	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
4	—	—	4	—	—	+	—	4	—	—
5	—	—	—	—	—	+	—	—	—	6
6	—	—	2	—	4	+	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
Lactis und Coli	**28. 2. Arabinose**	**63° 15′**	**63° 20′**	**63° 25′**	**63° 30′**	**4. 3. Arabinose**	**63° 15′**	**63° 20′**	**63° 25′**	**63° 30′**
1 c	—	3	—	3	3	+	—	—	—	—
2 c	—	3	—	3	—	+	2	—	3	3
4 c	—	3	3	3	3	+	3	3	—	—
5 c	—	3	3	3	3	+	3	—	—	—
6 c	—	3	3	3	3	+	2	3	3	3
7 c	—	3	3	3	3	+	3	3	—	—

Tabelle 11. fl. = flüssig; Inf. = Infektion.

Lactis	3. 3. Arabinose	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′	8. 3. Arabinose	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′
1	+	7 fl.	—	—	—	+	4	—	4	—
2	—	—	—	—	—	+	—	6	—	—
4	—	2	—	—	—	+	—	—	—	3
5	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
6	—	—	4	4	—	+	—	—	—	—
7	+	—	4	—	—	+	—	—	—	—
Lactis und Coli	**3. 3. Arabinose**	**63° 15′**	**63° 20′**	**63° 25′**	**63° 30′**	**8. 3. Arabinose**	**63° 15′**	**63° 20′**	**63° 25′**	**63° 30′**
1 c	—	—	—	—	6 Coli	+	—	—	—	—
2 c	+	6	4	—	—	+	—	—	—	—
4 c	—	4	4	—	—	+	—	—	—	—
5 c	—	—	—	—	6	+	—	—	—	6
6 c	—	3	4	—	—	+	—	—	—	6 Coli
7 c	—	6 Inf.	—	3	3	+	—	—	—	—

Bei einem Vergleich der 3 Tabellen (9, 10 und 11) wirkt sich für Str. lactis deutlich die Verschiedenheit der jeweilig gleichartigen Behandlung aus. Wie aus der nochmaligen Erhitzung festzustellen ist, kann auch eine längere Einwirkungszeit keine Wandlung hervorrufen, lediglich wird die Arabinose nach einiger Zeit von allen Kulturen gesäuert. Nur St. 6 zeigt sich mit faecium-typischer Lackmusmilchreaktion und fehlendem Arabinosesäuerungsvermögen bei der ersten Erhitzung thermoresistent (Tab. 10), nach einer nochmaligen Erhitzung St. 5 (Tab. 10) und St. 4 (Tab. 11) mit atypischer Reaktion, St. 6 dagegen nicht mehr. Genau die gleichen Schwankungen sind für die Kulturen des Str. lactis mit Bact. coli festzustellen. Am 28. 2. erwiesen sich 5 Stämme mit atypischer Reaktion und fehlender Arabinosesäuerung als hitzeresistent, am 4. 3. nur 2 Stämme mit gleicher Lackmusmilchreaktion, aber vorhandenem Arabinosesäuerungsvermögen. Dagegen überstanden am 3. 3. (Tab. 11) nur 3 Stämme die Dauerpasteurisierung mit atypischer Reaktion und fehlendem Arabinosesäuerungsvermögen und am 8. 3. nur 2 Stämme, von denen die 6c-Kultur sich vorher als nicht-hitzeresistent erwiesen hatte. Die Thermoresistenz nimmt mit der Dauer der Aufbewahrung (Einwirkungszeit) fast stets ab oder geht ganz verloren. In der Tab. 11 zeigt sich eine scheinbare Zunahme für 6c, hier ist jedoch nicht der Str. lactis der hitzeresistent gewordene Organismus, sondern Bact. coli. Coli reagiert in Lackmusmilch mit ungefähr derselben Erscheinung wie atypisch 7v (etwas blasser), ist jedoch an dem z. T. gelochten, z. T. zerrissenen Grinnsel unzweideutig zu erkennen. Dieselbe Erscheinung war bei 1c zu beobachten.

Tabelle 12.

Lactis-Nr.	6. 3. 1. Passage					11. 3. 1. Passage					8. 3. 2. Passage				
	Arab.	63°				Arab.	63°				Arab.	63°			
		15′	20′	25′	30′		15′	20′	25′	30′		15′	20′	25′	30′
1	+	—	4 —	3	—	(+)	2	4	3	—	(+)	4	4 (+)	—	—
2	—	—	Inf.	2 +	—	(+)	—	—	—	4	(+)	3	—	—	—
4	+	4	2	2	—	+	4	4	4 +	4	+	4	4	4	4 +
5	—	—	2	—	—	(+)	4	4	2	4 +	(+)	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	(+)	—	—	—	4	+	4 +	—	4	—
7	+	—	2	—	—	+	2	2	2	3	+	4	—	4	—
mit Coli															
1 c	—	4 Coli	4 Coli	4	4	+	Coli	Coli	Coli	Coli	(+)	4	4 Coli	4 (+)	3
2 c	—	4 Coli	4 Coli	4 Coli	2	(+)	Coli	4	4	4 (+)	+	3	3	4 Coli	—
4 c	—	4 Coli	4 +	4 Coli	4 Coli	+	4	4	4	4	+	4	4	4	4
5 c	—	4	4 Coli	4 (+)	4	+	Coli	Coli	4	Coli	+	2	2	2	2
6 c	+	4	4	4	4 Coli	+	2	2	—	2 +	+	—	—	—	—
7 c	+	4 Coli	4 Coli	4 Coli	4 Coli	+	2 Coli	2 Coli	2 Coli	2 Coli	+	6 Coli	6 Coli	6 Coli	6 Coli

Tabelle 12 (Forts.).

Lactis-Nr.	12. 3.	2. Passage				10. 3.	3. Passage				13. 3.	4. Passage			
	Arab.	63⁰				Arab.	63⁰				Arab.	63⁰			
		15′	20′	25′	30′		15′	20′	25′	30′		15′	20′	25′	30′
1	+	4 —	4	2	2	+	—	—	—	—	(+)	3	4	4	—
2	(+)	2	2	4 —	4	+	—	—	—	—	+	2	—	3	—
4	+	4	4	4	4 +	+	4	4	4	4 +	+	4	2	4	4
5	(+)	—	—	—	4	+	—	—	—	—	+	—	4 +	2	2
6	+	—	—	4 —	—	+	—	—	—	—	+	—	—	4	—
7	+	3	3	4	—	+	—	—	4 —	—	+	—	4	4	4 +
mit Coli 1 c	+	3	6 Coli	3	3	+	—	—	—	—	+	3	3	2	4 —
2 c	+	3	—	3	4	+	—	—	—	—	+	3	—	3	—
4 c	+	4	3	—	Coli	+	—	—	—	—	+	4	2	2	2
5 c	+	3	4	3	—	+	—	—	—	—	+	3	3	3	—
6 c	+	2	2	2	2	+	—	2	—	—	+	4	2 —	—	2
7 c	+	2 Coli	2 Coli	2 Coli (⊥)	2 Coli	+	2	2	2 —	2	+	2	2	2	4 +

Nachdem durch diese Versuche eindeutig das inkonstante Verhalten der Kulturen bei der einmaligen der Verdauung analogen Behandlung sich gezeigt hatte, sollten die Auswirkungen der Enzyme in mehreren Passagen gleicher Anordnung geprüft werden. Die 1. Passage wurde am 4. 3. angesetzt, die 2. am 6. 3., die 3. am 8. 3. und die 4. am 11. 3. Die 1. und 2. Passage wurde nach 5 bzw. 4 tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur nochmals erhitzt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 12 zusammengefaßt.

Die Auswertungen der ersten Erhitzung der 1. Lactispassage gaben wieder ein ganz anderes Bild als diejenigen in den Tab. 9, 10 und 11. Besonders auffallend wirkte sich 5 Tage später die 2. Erhitzung aus. Während bei den vorhergehenden Versuchen nach längerer Einwirkungszeit keine Zunahme der Hitzeresistenz konstatiert werden konnte, ist sie bei den vorliegenden Versuchen außerordentlich groß. Bemerkenswert erscheint auch die häufige faecium-typische Lackmusmilchreaktion. Die 2. Passage bewirkte eine Thermoresistenz-Anzüchtung für St. 4, die auch in den folgenden Passagen bei faecium-typischer Lackmusmilchreaktion und, soweit geprüft, bei typischem Arabinosesäuerungsvermögen konstant blieb. Die Auswirkungen schwankten dagegen bei den anderen Stämmen gegenüber der 1. Passage wesentlich. Es konnte z. T. eine Abnahme, z. T. eine Zunahme der Hitzetoleranz festgestellt werden. Die 2. Erhitzung zeigte wieder im Gegensatz zu den früheren Versuchen eine deutliche Zunahme der Resistenz analog der 1. Passage mit Ausnahme der St. 6 und 7, die nur 25 Min. lang die Temperatur von 63⁰ C aushielten. Bei der 3. Passage zeigten die Stämme mit Ausnahme des vorerwähnten St. 4 ein unerwartetes Verhalten. Nur St. 7 überdauerte 25 Min. 63⁰ C, alle anderen überlebten nicht einmal 15 Min.!

Ganz verschieden hiervon fiel wieder die 4. Passage aus. Alle Stämme hielten 25 Min. aus, St. 4, 5 und 7 waren thermoresistent. Seltsam war die Lackmusmilchreaktion vor allem bei St. 5, nach 20 Min. zeigte sie das typische Bild für Str. faecium, nach 25 und 30 Min. reagierte er jedoch verzögert lactis-typisch, wie es z. B. auch bei St. 1 der 2. Passage bei wiederholter Erhitzung und St. 4 — 1. Passage beobachtet werden konnte.

Starke Abweichungen mit den früheren Untersuchungen zeigten auch die Symbioseversuche der Lactisstämme mit Bact. coli. Alle Kulturen erwiesen sich als hitzeresistent. Die Lackmusmilchprobe war nur mit Ausnahme von 2c, 30 Min. immer faecium-typisch. Daß diese Lackmusmilchreaktionen jedoch einzig und allein von den ehemaligen Str. lactis bewirkt wurden, möchten wir stark bezweifeln. Es kommen sicherlich stets die Auswirkungen des Colistammes, der durch die Galle aller Wahrscheinlichkeit nach besonders gekräftigt wurde, hinzu. (Bact. coli schwache Rötung und Gerinnung, Str. lactis Reduktion, Gerinnung und Rötung von oben.) Greifen nun diese beiden verschiedenartigen Reaktionen ineinander, so wäre es durchaus möglich, daß eine faecium-typische Reaktion das Endergebnis darstellt, sofern die Vorzüchtung und Erhitzung wie vorliegend ist. Das Ineinandergreifen der Reaktionen könnte folgendermaßen vor sich gehen: Das Reduktionsvermögen von Str. lactis kommt bei gleichbleibender Säuerung infolge der Stoffwechselprodukte von Bact. coli nicht auf. Nach kurzer Zeit (24—48 Std.) stirbt jedoch Coli durch die starke Säurebildung ab, so daß nunmehr die Reduktion eintreten kann und eine faecium-typische Reaktion auftritt, die ohne Zutun von Bact. coli vielleicht lactis- oder verzögert lactis-typisch geworden wäre. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß Bact. coli das Gasbildungsvermögen trotz Säuregerinnung eingebüßt hatte, da bei den Kulturen 1c—5c keine „Blähungserscheinungen" auftraten, wie sie bei 6c und 7c deutlich beobachtet werden konnten. Eine nochmalige Erhitzung der ersten Passage zeigte die Konstanz der Hitzeresistenz an. Die Lackmusmilchreaktion fiel bei 6c und 7c verzögert lactis-typisch aus, bei 7c trat wieder Zerreißung des Gerinnsels durch Gasbildung des Bact. coli auf. Hier scheint das Reduktionsvermögen von Str. lactis stärker zu sein als die Auswirkungen von Bact. coli hinsichtlich der Rötung. Coli könnte durch die vermehrte Milchsäurebildung geschwächt worden sein.

In der 2. Passage trat Bact. coli nur noch bei der Kultur 7c in Erscheinung und zwar so stark, daß die Lackmusmilchreaktion atypisch 6 ausfiel. In den anderen Kulturen schien Bact. coli bereits stark geschwächt oder ganz abgestorben zu sein. Konstant hielt sich nur die Kultur 4c, die sich auch ohne Bact. coli als konstant faecium-typisch erwiesen hatte. Ein 2. Pasteurisierungsversuch zeigte wieder die aus den vorhergehenden Tabellen bekannten Schwankungen. Bei der Kultur 7c ist Bact. coli wieder hinsichtlich des Säuerungsvermögens (Rötung) geschwächt.

Bei der 3. Passage überlebte im Gegensatz zu derselben Passage ohne Bact. coli, die allgemein weitgehendste Übereinstimmung zeigt, Kultur 4c die Pasteurisierung nicht, wohl aber die Kultur 7c mit verzögert lactis-typischer Lackmusmilchreaktion. Bact. coli trat in der 3. Passage nicht mehr auf, war demnach durch die Säure zugrunde gegangen. Die Erhitzung der Kulturen der 4. Passage auf 63° C überlebten 4 Stämme 30 Min., St. 1 und 5 — 25 Min. Die Lackmusmilchprobe war variabel.

Überblickt man die Tab. 12 (wie auch Tab. 10), so ist auffallend, daß nur drei verschiedene Lackmusmilchreaktionen auftraten (2, 3 und 4), bei denen immer Reduktion stattfindet (6 wurde ausschließlich von Bact. coli bewirkt). Das Arabinosesäuerungsvermögen der erhitzten Kulturen (gekennzeichnet durch + vorhanden, — nicht vorhanden) ist sehr schwankend. Arabinose wird von Lackmusmilchkulturen gleicher Reaktionen teils gesäuert, teils nicht gesäuert. Ob bei den Symbioseversuchen mit Bact. coli in der 1. Passage der veränderte Str. lactis die typische Faecium-Reaktion (was wir bezweifeln) ausführte, konnte von uns nicht nachgeprüft werden, da die Versuche abgeschlossen werden mußten. Die Nachprüfung könnte sehr einfach so geschehen, daß von den Petrischalenkulturen, die mit den erhitzten und wieder abgekühlten Milchproben anzulegen wären, Streptokokken isoliert und in Lackmusmilch geprüft würden.

Umwandlungsversuche von Str. lactis und Str. lactis mit Bact. coli in alkalischer Maische mit 10proz. Gallezusatz.

Diese Versuche sollten uns Aufschluß über die Frage geben: Wird eine evtl. Umwandlung durch Enzymwirkung (von außen) hervorgerufen oder findet die gleiche evtl. Umwandlung auch ohne sie statt? Diese Versuche wurden mit durch Sodazusatz alkalisierter Maische (p_H ca. 9,0) mit Kreide und einem 10 proz. Gallezusatz durchgeführt. Eine eindeutige Klärung ergaben, wie aus der Tab. 13, in der alle Ergebnisse zusammengefaßt sind, hervorgeht, diese Untersuchungen nicht. Es scheint jedoch wahrscheinlich, daß bei Gegenwart der Verdauungsenzyme eine Umwandlung in verstärktem

Tabelle 13.

fl. = flüssig; Inf. = Infektion von Coli.

Lactis-Nr.	10. 3.	4. Pass. v. 9. 3.				12. 3.	6. Pass. v. 11. 3.				13. 3.	1. Pass. v. 6. 3.			
	Arab.	63°				Arab.	63°				Arab.	63°			
		15′	20′	25′	30′		15′	20′	25′	30′		15′	20′	25′	30′
1	(+)	—	—	—	2 (+)	(+)	2	4 (+)	4	—	(+)	—	—	7 fl.	—
2	(+)	—	—	—	4 —	(+)	—	—	2	4 —	(+)	—	—	6	—
4	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	3	3	3	3
5	(+)	—	6	—	—	(+)	—	4	—	—	+	—	—	—	—
6	(+)	—	—	—	—	(+)	—	—	—	4 —	(+)	—	—	2 (+)	—
7 mit Coli	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	2 +	3	3	3
1 c	+	—	—	—	2 Inf.	+	—	2	—	—	+	3	2	6	3
2 c	+	—	4 —	4	—	+	—	2	—	—	+	3	3	3	2 (+)
4 c	+	—	—	—	6 Inf.	+	—	—	4 —	—	+	1 (+)	3	3	3
5 c	+	—	—	6 Inf.	4 Inf.	+	—	—	—	—	+	3	3	3	3
6 c	+	4	—	—	—	+	—	—	—	—	+	3	3	3	3
7 c	+	2 Inf.	1 Inf.	4 (+)	—	+	—	3 Inf.	3 Inf.	—	+	3	4 Inf.	3	—

Tabelle 13 (Forts.).

fl. = flussig; Inf. = Infektion von Coli.

Lactis-Nr.	13. 3. 2. Passage vom 7. 3. Arab.	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′	14. 3. 3. Passage vom 8. 3. Arab.	63° 15′	63° 20′	63° 25′	63° 30′
1	(+)	—	—	—	—	—	—	—	2	4
2	(+)	—	—	3	—	–	4	—	3	—
4	(+)	2	2	2	—	—	3	—	3	4
5	+	—	—	—	—	—	—	—	7 fl.	—
6	+	—	—	3	—	—	—	—	—	—
7	+	—	—	—	—	+	—	4	—	—
mit Coli										
1 c	+	—	3	3	3	+	—	—	—	—
2 c	+	3	3	3	3	+	—	—	3	—
4 c	+	3	3	3	3	+	—	—	2	—
5 c	+	3	4 (+)	3	3	+	3	3	3	3
6 c	+	2 (+)	3	3	3	+	—	—	2	—
7 c	+	3	3	3	3	+	—	3	3	—

Maße möglich ist. Bei den einzelnen Passagen und einem Vergleich mit Tab. 5 stellten sich wieder große Schwankungen heraus. Eine zahlenmäßig größere Umzüchtung oder größere Konstanz wurde durch mehrere Passagen nicht erzielt.

Das mit Milchsäurebakterien infizierte Pepsin und Lab wurde der 0,6 proz. Ausgangssalzsäurelösung zugesetzt und geschüttelt. Eine Kontrolle ergab, daß die Milchsäurebakterien hierdurch abgetötet worden waren, während die Enzyme nicht geschädigt wurden. Die Infektionen des Trypsins und Erepsins bestanden aus Alkalibildnern, z. T. alkalibildenden Sporenbildnern, die lediglich in der Lackmusmilch etwas störten, dagegen aber eine größere erwünschte Angleichung an die Darmflora darstellten.

Zusammenfassung.

Für die vorliegenden Umwandlungsversuche wurden Lactisstämme benutzt, die durch längere Fortzüchtung und häufige Prüfung eine Gewähr dafür boten, daß es sich um absolute Reinkulturen handelte und nicht etwa um mit Str. faecium infizierte Mischkulturen.

Für die nicht einheitlich angewendete Hitzeresistenzprüfung wurde die gesetzlich verlangte Dauerpasteurisierung (63° C — ½ Std.) als richtunggebend vorgeschlagen und benutzt. Die Lackmusmilchreaktion nach Heim 1a wurde als lactis-typisch, 2a als faecium-typisch angesprochen. Das Arabinosesäuerungsvermögen bzw. -unvermögen zusammen mit obigen Merkmalen bezeichneten wir als typisch für Str. faecium bzw. Str. lactis.

Die ausgewählten Lactisstämme säuerten mit einer Ausnahme anfänglich schneller bei 37° C, die größte Säuremenge wurde mit derselben Ausnahme jedoch bei 30° C gebildet. 63° C wurden keine 10 Min. ausgehalten.

Die Lackmusmilchreaktionen waren lactis-typisch nach Heim 1a. Arabinose wurde nicht oder nur sehr schwach vergoren.

Die Umwandlungsversuche zeitigten folgende Ergebnisse:

1. Eine Hitzeresistenz-Anzüchtung durch Gewohnung an höhere Temperaturen gelang nicht.

2. Durch mehrere Passagen in Milch, Milch mit Pepton, Maische, Maische mit Pepton und Roggenschrotabkochung (alle Nährmedien erhielten einen Kreidezusatz) gelang z. T. eine Umwandlung von Str. lactis in Str. faecium, die sich jedoch in einer weiteren Passage z. T. als inkonstant erwies. Die besten Erfolge konnten in Maische und vor allem in Roggenschrotabkochung erzielt werden.

3. Durch zwei weitere Passagen in alkalischer Maische mit Galle eine größere Konstanz anzuzüchten, gelang nicht.

4. Wurden die die erste Erhitzung auf 63° C mindestens 15 Min. überlebenden Streptokokken der 2. Passage in alkalischer Maische mit Galle nach 3 Wochen nochmals erhitzt, so konnte z. T. eine Zunahme, z. T. eine Abnahme der Resistenz festgestellt werden. Alle Kulturen der 2. Passage in alkalischer Maische mit Galle aus der 7. Passage in Roggenschrotabkochung, die 63° C überstanden hatten, blieben auch bei der 2. Pasteurisierung konstant hitzeresistent und bewirkten in Lackmusmilch und Arabinosebouillon (mit einer Ausnahme) die faecium-typische Reaktion, so daß die Annahme der konstanten Umwandlung des Str. lactis in Str. faecium berechtigt erscheint.

5. Eine Umwandlung durch 4 Tage lang alkalisch gehaltene Milchkulturen gelang lediglich für einen Ausgangsstamm, der nach der 2. Erhitzung typisch reagierte. Die größte Konstanz zeigten die Kulturen aus Maische und Roggenschrotabkochung, die ebenfalls diese Passage durchmachten.

6. Bei einer zu verschiedenen Zeiten erfolgten gleichen Behandlung der Lactisstämme mit und ohne Bact. coli analog der menschlichen Verdauung traten große Schwankungen hinsichtlich der Auswirkungen auf. Eine konstante Umwandlung wurde nie erzielt. Die 8. Passage der ehemaligen Lactisstämme in Maische und Roggenschrotabkochung, analog der Verdauung behandelt, zeitigte für alle Stämme eine Umwandlung in Str. faecium mit allen typischen Merkmalen.

7. Ein 4. Versuch mit Enzymen, dem sich 3 weitere Passagen gleicher Behandlungsmethode anschlossen, brachte z. T. positive Ergebnisse. Ein Stamm konnte konstant-typisch umgezüchtet werden. Die Parallelversuche mit Bact. coli zusammen ergaben ein unklares und wenig einheitliches Bild.

8. Verschiedene Passagen in alkalischer Maische mit einem 10 proz. Gallezusatz konnten z. T. eine typische Umwandlung hervorrufen, die jedoch meist eine geringe Konstanz aufwies. Weiterhin könnten diese Versuche mit den Enzymversuchen verglichen zu der Annahme berechtigen, daß die Enzyme bei der Umwandlung fördernd wirken.

9. Die Kolonien der Petrischalenkulturen und ihre Organismen waren hinsichtlich ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften identisch mit denjenigen, die Henneberg und Wendt (2) in pasteurisierter Milch gefunden und als Faeciumstämme diagnostiziert hatten.

10. Die Umwandlungsformen wiesen allgemein nur eine geringe Konstanz auf, eine Umwandlung in die typische Faeciumform dagegen blieb auch meist konstant.

11. Für das fast regelmäßig zu beobachtende „Springen“ konnte keine Erklärung gefunden werden.

Schlußbetrachtung.

Während Meyer und Schönfeld auf Grund ihrer Versuche und Wirth ebenfalls auf Grund seiner Versuche und bisher in der Literatur nicht beschriebener einwandfreier Umzüchtungen die Identität des Str. lactis mit dem Str. faecium (Enterococcus) ablehnen und beide als völlig gleichwertige Arten, nicht Varianten, nebeneinander mit grundsätzlich verschiedenen biologischen Merkmalen betrachten, und auch Heim und Schlirf auf die Frage: „Was ist es mit der Einheit der Streptokokken?“ mit „Nichts“ antworten, vertreten Kruse, Gundel, Demeter u. a. die gegenteilige Ansicht.

Gundel glaubt, daß das kulturelle Verhalten von Str. lactis sich lediglich durch den „Standortswechsel“ etwas verändert hat, und stützt sich besonders darauf, daß nach einer Einsaat in Urin der typische Str. lactis sich immer veränderte und dem Enterococcus identisch wurde. Trotzdem tritt er für eine Trennung der Enterokokken von den Milchsäurebakterien und Beibehaltung des Namens „Enterococcus“ ein, soweit es sich um Organismen handelt, die im Darm, in der Galle usw. nachgewiesen werden.

Wie aus unseren Versuchen eindeutig hervorgeht, ist eine Umzüchtung des Str. lactis in Str. faecium schon durch Passagen in bestimmten Nährmedien durchaus möglich. Nach unseren „Verdauungsversuchen“ besteht weiterhin die Möglichkeit, daß der Str. lactis sich im menschlichen oder tierischen Körper umwandeln kann. Wir glauben nach unseren Versuchen jedoch nicht (starkes Schwanken und große Inkonstanz), daß diese Möglichkeit der Grund des gehäuften Vorkommens von Str. faecium im Darminhalt ist, sondern sind der Ansicht, daß im Darm stets wieder eine Neuinfektion des Nahrungsbreies stattfindet.

Daß es Übergangsformen gibt, die von Heim und Schlirf nicht, wohl aber von Sach (und Gohar) gefunden und Str. faecium-lactis genannt wurden, dürfte ebenfalls aus unseren Versuchen hervorgehen. Wir sehen trotz unserer gelungenen Umzüchtungen jedoch noch keinen Beweis für die Identität von Str. lactis und Str. faecium, die als Milchsäurestreptokokken natürlich enge Verwandtschaft zeigen, können aber auch die Ansichten von Kruse, Ayers und Johnson, Demeter und Gundel nicht ganz von der Hand weisen. Zahlreiche Versuche müßten u. E. noch angestellt werden, die eindeutig eine einheitliche Umzüchtung einer größeren Anzahl von typischen Lactisstämmen ergeben müßten; hierbei dürfte ein Ausgehen von einer Einzellkultur besonders wertvoll und zu empfehlen sein. Ebenso müßte noch untersucht werden, ob der evtl. umgewandelte Str. lactis im Sinne des Enterococcus pathogen werden kann, oder ob die pathogenen Enterokokken eine selbständige Gruppe darstellen, die von den Milchsäurestreptokokken (Str. lactis und Str. faecium) zu trennen sind.

Während Gundel noch eine Trennung auf Grund der Fundorte für zweckmäßig hält, treten wir vorläufig noch für eine Trennung auf Grund der verschiedenen physiologischen Eigenschaften von Str. lactis und Str. faecium (s. o.), die gleich nach der Isolierung zu untersuchen sind, ein.

Literaturverzeichnis.

Bång, Folke, noch nicht veröffentlicht. — Bagger, S. V., zit. nach Schönfeld. — Deger, H., Untersuchungen über das Vorkommen von Milchsäurebakterien auf grünen Futterpflanzen. (Milchwirtsch. Zeitg. Nr. 37, 38a u. 39. 1932.) — Demeter, K. J. (1), Studien über Milchsaurestreptokokken. I. Mitteilung. Zur Kenntnis der Lackmusmilchprobe mit Anwendungen auf die Molkereipraxis. Milchw. Forsch. Bd. 5. 1928. S. 505—531. — Demeter, K. J. (2), Studien über Milchsaurestreptokokken. II. Mitteilung. Der Streptococcus lactis (Lister) Lohnis und seine Beziehungen zu den Fäkalstreptokokken. (Milchw. Forsch. Bd. 8. 1929. S. 201—267.) — Diethelm, A., Studien über die Bakterienflora des normal reifenden Tilsiter Käses. (Inaug.-Diss. Kiel. 1932.) — Demeter und Pfundt, Studien über Milchsäurestreptokokken. V. Mitteilung. Über die Konstanz der Gärkraft von Fäkalstreptokokken bei langjähriger Milchkultur. (Milchw. Forsch. Bd. 17. 1935. S. 44—50.) — Disselhorst, R., Die Anatomie und Physiologie der großen Haussäugetiere. 5. Auflage. Berlin 1923. — Esten, W. M., zit. nach Seibel. — Gohar, M. A., Untersuchungen über die Streptokokken der unteren Darmabschnitte. (Zentralbl. f. Bakt. usw. I. Org. Bd. 134. 1935. S. 8—13.) — Grapengeter, Beitrag zur Kenntnis der epiphytischen Bakterienflora gesunder grüner Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung einiger für die Milchwirtschaft wichtigen Wiesenpflanzen. Inaug.-Diss. Kiel 1931. — Gundol, M., Über die ätiologische Bedeutung der „Enterokokken" bei Blasen-Nierenerkrankungen und über die Beziehungen der „Enterokokken" zu den Milchsäurestreptokokken. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 99. 1926. S. 469—478.) — Gundel, M., Die Enterokokken. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 109. 1928. S. 384—392.) — Grenz, zit. nach Stölting. — Heim, L., Milchsäure- und andere Streptokokken. (Ztschr. f. Hygiene. Bd. 101. 1924. S. 104—118.) — Heim, L. und Schlirf, K., Was ist es mit der Einheit der Streptokokken? (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 100. 1926. S. 24—47.) — Hennerberg, W. (1), Handbuch der Gärungsbakteriologie. Berlin 1926. — Henneberg, W. (2), Einfluß von Milch, Milcherzeugnissen, Sauermilch, Kefir, Yoghurt, Reformyoghurt, Milchzucker, Käse-Milchsäurebakterien-Reinkulturen auf die Darmflora des Menschen. (Molk.-Zeitg. Nr. 90 u. 91. Hildesheim 1934.) — Henneberg, W. (3), Zur Kenntnis der stäbchenförmigen Milchsäurebakterienarten. Vorkommen im Menschen und Tier. Ansiedlungsversuche durch Genuß von Milch, Käse und Reinkulturen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Orig. Bd. 91. 1934. S. 102—135.) — Henneberg und Wendt (1), Untersuchungen über hitzresistente Coli-Stämme. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Orig. Bd. 93. 1935. S. 39—45.) — Henneberg und Went (2), Hohere Keimzahl an Milchsäurestreptokokken nach der Pasteurisierung als vorher. (Molk.-Zeitg. Nr. 27. Hildesheim 1935.) — Keitel, Fr., Hitzeresistente Milch-Milchsäure-Streptokokken unter bes. Berücksichtigung ihres Verhaltens in der Zuckerreihe und bei der Lackmusmilchprobe. Inaug.-Diss. Kiel 1931. — Kreipe, Untersuchungen über die Milchsäurebakterienflora des Kuhpansens. Inaug.-Diss. Kiel 1927. — Kruse, zit. nach Heim und Schlirf, Meyer und Schönfeld. — Maurer, W., Die Darmbakterienflora gesunder, erwachsener Menschen und ihre Beeinflussung durch den Genuß von Milch und Milcherzeugnissen. — Beitrag zur Kenntnis der Darm-Milchsaure-Bakterien. Inaug.-Diss. Kiel 1929. — Meyer und Schönfeld, Über die Unterscheidung des Enterococcus vom Streptococcus viridans und die Beziehungen beider zum Streptococcus lactis. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 99. 1926. S. 402—416.) — Orla-Jensen, zit. nach Seibel und nach Henneberg (1). — Sach, Fr., Inaug.-Diss. Kiel, noch nicht veröffentlicht. — Schönfeld, H., Zur Morphologie und Biologie der Stuhlstreptokokken. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 99. 1926. S. 388—401.) Seibel, E., Hitzefeste Bakterien in der bei 63° C ½ Stunde dauerpasteurisierten Milch. Inaug.-Diss. Kiel 1925. — Stölting, J., Über die Streptokokken des normal reifenden Tilsiter Käses. Inaug.-Diss. Kiel 1935. — Wirth, E., Zur Kenntnis der Streptokokken. I. u. II. Mitteilung. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 99. 1926. S. 266—292 u. 438—460.) — Voß, Albr., Die Milchsäurebakterienflora im Darminhalt des Rindes und ihre Beeinflussung durch Rübenblattfütterung. Inaug.-Diss. Kiel 1928. Milchwirtsch. Forsch. Bd. 8. 1929. S. 383—422. — Weigmann, zit. nach Demeter (2).

Nachdruck verboten.

The Production of Gluconic acid by Penicillium chrysogenum[1]).

[256th Contribution from the Color and Farm Waste Division, Bureau of Chemistry and Soils, United States Department of Agriculture, Washington, D. C.]

By **A. J. Moyer, O. E. May** and **H. T. Herrick.**

With 2 figures in the text.

The formation of gluconic acid by microörganisms was first observed by Boutroux (2) more than 50 years ago in glucose cultures of Mycoderma aceti. Since then it has been found rather frequently in glucose cultures of various oxidizing bacteria, but in general the yields have been low, and when the quantity formed was large, the oxidation proceeded at a slow rate. Recently, however, Takahashi and Asai (9) have isolated a bacterium of the acetic type "Hoshigaki", which is capable of oxidizing glucose to gluconic acid at a fairly rapid rate and with good yields.

Molliard (6) in 1922 isolated gluconic acid as the calcium salt along with citric and oxalic acids from sucrose cultures of Aspergillus niger, and during the past 10 years it has come to be recognized as a commonly occurring product of the mold metabolism of glucose. The recent monograph by Bernhauer (1) includes a thorough review of the literature relating to gluconic acid.

In 1929 May, Herrick, Moyer, and Hellbach (3) reported the results of an investigation of the semi-plant scale production of gluconic acid from commercial glucose by a strain of Penicillium luteum purpurogenum, in which yields of gluconic acid were obtained in a period of 11 days, equivalent on the average to 57% of theory. However, this organism was definitely lacking in certain desirable qualities, such as biochemical and vegetative vigor, and constant observation and close cultural control were necessary in order to maintain cultures capable of giving uniform results.

In the course of a survey initiated shortly after the completion of this work, several strains of P. chrysogenum were encountered which gave good yields of gluconic acid and in addition possessed the characteristics lacking in P. luteum purpurogenum. Furthermore, the oxidation was not accompanied by the formation of other acids or products which might complicate the ready recovery and purification of the acid or its salts. An investigation was undertaken to determine some of the factors which might improve the oxidation by a selected strain of P. chrysogenum. At the conclusion of the work it seemed desirable to trace the history of the organism, originally secured from the collection of Dr. Charles Thom, and it was then found that it was identical with the P. chrysogenum Ad. 11 included in the studies of Raistrick and his associates (7). These investigators found that it produced considerable quantities of gluconic acid and mannitol when cultured on Czapek-Dox medium containing 5% glucose. The quantity of oxygen available for the organism was restricted

[1]) Presented before the Division of Biological Chemistry, at the meeting of the American Chemical Society, Washington, D. C., April, 1933.

by controlled aeration, a condition which had been found to favor the accumulation of mannitol in cultures of certain Aspergilli. The conditions of these experiments and those to be reported in this paper are, therefore, not at all comparable, and it is not surprising that considerable differences were found in the relative quantities of gluconic acid produced.

Organism.

Penicillium chrysogenum Thom.

Literature — Raistrick, H., et al, Phil Trans. Roy. Soc. London, Ser B, 220: 61, 348—353 (1931).

Culture 5034.11, obtained from Dr. Charles Thom, who received it from H. Raistrick as Ad. 11. Isolated from molded tobacco at Ardeer, Scotland. Colonies on peptone glucose agar velutinous, with narrow white margins, white in reverse, bearing conidia quickly over nearly entire surface. Conidial areas "pea green". (Ridgeway pl. XLVII.) Hyphae septate, granular, hyaline, with a very thin gelatinous sheath. 4—8 μ in thickness. Conidiophores 4—8 × 40—120 μ, averaging about 80 μ. Penicillus asymmetrically biverticillate, 10—40 × 15—50 μ or rarely with one verticil of rami. Rami cylindrical, 3—6 × 9—16 μ. Metulae 2—5, radiate, 3—5 × 10—16 μ, lanceolate. Sterigmata 3—4 × 7—15 μ, lanceolate to obspatulate. Conidia catenulate, hyaline, globose, smooth, with a thin gelatinous outer wall 3—6 μ.

Methods.

Most of the cultures were grown in 200 cc. Pyrex Erlenmeyer flasks containing 75 cc. of culture medium. Two other types of flasks were employed in special experiments. All flasks were stoppered with cotton plugs. Sterilization was effected by autoclaving the flasks containing the culture medium at 15 pounds steam pressure for 15 minutes. Stock solutions were prepared for each nutrient salt and the desired dilution made in the preparation of the culture series. The glucose used was the commercial, crystalline monohydrate. All cultures were incubated in a large room held at 30° C. The harvesting of the cultures was carried out rapidly and satisfactorily according to the following procedure: The culture was heated to 90° C. and filtered through cheesecloth, and the mat was thoroughly pressed. The mat was next returned to the flask, 100 cc. of distilled water added, heated to boiling, filtered, and the mat again pressed out, after which it was labelled and dried to constant weight at 90—95° C. The volume of the combined filtrate was measured, and aliquots were taken for the determination of acid and sugar. The analytical procedures used have been described elsewhere (4). The culture solutions were periodically examined for the presence of oxalic and citric acids, but neither of these substances was encountered under normal conditions of culture. The yields were calculated as the ratio, expressed in per cent, of glucose used for the production of gluconic acid to the total pure glucose originally present in the culture solution.

Variations in the appearance of the cultures were sometimes quite pronounced. In order to keep a record of such cultural characteristics, an empirical method of scoring each culture was used. For example, sporulation was given a maximum score of 5 when there was an uniform and heavy crop of spores ever the entire surface. Similarly, when the entire mat was wet it was given a score of 5, and a like score was given in cases of pronounced mat folding. In all characters scored, values ranging from 5 to 0 were recorded.

Experimental.

A survey of the action of molds on glucose has been in progress for some time in this division. The organisms are cultured under standard nutrient conditions for a definite period of time, at the termination of which the culture liquors are analyzed. While such a procedure does not give the optimum nutrient conditions for each organism, previous investigations

have indicated that it will permit the recognition of marked ability of molds to produce acids and in general will reveal outstanding biochemical activity.

Table 1 indicates the comparative production of gluconic acid by 5 species of Penicillium under survey conditions. Preliminary experiments indicated that P. baculatum, P. citrinum and P. variabilis were much less vigorous than the two cultures of P. chrysogenum. There was little choice between P. chrysogenum 26 and 5034.11 as producers of gluconic acid.

Table 1. Penicillia which produce Gluconic acid under survey conditions.
Commercial glucose = 15% (11.2 gm./culture).
Salts = {$NaNO_3$ = 2.5 gm./L.; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ = 0.500 gm./L.; H_3PO_4 = 0.054 gm./L.; KCl = 0.100 gm./L.}
Culture age = 10 days.

Organisms	Gluconic Acid per Culture Grams	Dry Wt. of Mats per Culture Grams	Glucose Consumed per Culture Grams	Per Cent Yield of Acid Based on	
				Glucose Present	Glucose Consumed
P. baculatum Westling 4733.16	4.1	0.790	7.6	33.6	49.5
P. chrysogenum Thom 26 . .	6.6	0.475	8.9	54.1	68.1
P. citrinum Thom 4482 . . .	4.5	0.433	7.2	36.9	57.2
P. variabilis Wehmer 3551 . .	5.2	0.439	7.0	42.6	68.3
P. chrysogenum Thom 5034.11	6.4	0.611	9.0	52.5	65.3

Table 2. Comparative Gluconic acid Yields of P. luteum purpurogenum 2 A and P. chrysogenum 5034.11.
Salts: G {$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ = 0.250 gm./L.; H_3PO_4 = 0.027 gm./L.; KCl = 0.050 gm./L.}
M {$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ = 0.250 gm./L.; KH_2PO_4 = 0.300 gm./L.}
$NaNO_3$ = 2.5 or 5.0 gm./L.
Commercial glucose = 15% by weight (11.3 gm./culture).
Data based on average of duplicate cultures.
Culture age = 13 days.

Organisms	Salt Variations		Gluconic Acid	Dry Wt. of Mats	Glucose Consumed	Per Cent Yields of Acid Based on	
	M or G	$NaNO_3$ gm./L.	Grams	Grams	Grams	Glucose Present	Glucose Consumed
P. luteum purpurogenum 2 A	G	2.5	5.0	0.571	8.8	40.7	52.4
	2 × G	5.0	3.6	0.866	—	29.5	—
	M	2.5	3.0	0.382	—	24.7	—
	2 × M	5.0	2.5	0.568	6.0	20.3	38.3
P. chrysogenum 5034.11	G	2.5	3.8	0.500	6.0	30.9	58.2
	2 × G	5.0	3.1	0.760	6.4	25.2	44.5
	M	2.5	6.2	0.920	10.7	50.4	53.2
	2 × M	5.0	3.6	1.460	10.8	29.5	30.6

The results of previous work (3) on the production of gluconic acid by P. luteum purpurogenum seemed to justify a comparison of this organism with P. chrysogenum. The results given in Table 2 indicate that the optimum nutrient requirements of these 2 Penicillia are by no

means identical. They further establish that P. chrysogenum possesses definitely superior ability to produce gluconic acid. The M salt combination used in the early stage of this work was developed in previous research on the production of kojic acid by a strain of Aspergillus flavus, but it was not then recognized as being almost an optimum nutrient for P. chrysogenum, as subsequent work indicated. Preliminary experimentation seemed to justify a more complete investigation of the optimum nutrient conditions for the production of gluconic acid by this strain of P. chrysogenum.

Table 3. Effect of Nutrient Variations on Sporulation of P. chrysogenum 5034.11. Culture size — 50 cc. solution in 200 cc. Erlenmeyer flask.

	Grams of nutrients per liter of solution					Culture Appearance Scores			
						4 days		8 days	
	$FeCl_3$ 0.005 $Mn(NO_3)$0.005	NH_4NO_3	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	KH_2PO_4	Comm. Glucose	Spores	Mat Bulk	Spores	Mat Bulk
1	—	1.00	0.025	0.030	55	0	1.5	0	1.5
	+	1.00	0.025	0.030	55	1.5	1	2.5	1.5
2	—	0.500	0.025	0.030	110	0	1.5	0.7	1.7
	+	0.500	0.025	0.030	110	4	1.5	4.0	1.7
3	—	0.500	0.050	0.060	55	0.7	1.5	1.5	2.5
	+	0.500	0.050	0.060	55	4	1.5	4.0	2.5
4	—	0.250	0.025	0.030	220	5	1.5	5.0	1.7
	+	0.250	0.025	0.030	220	5	1.5	5.0	1.7
5	—	0.250	0.050	0.060	110	4	1.5	5.0	1.7
	+	0.250	0.050	0.060	110	4.7	1.5	5.0	1.7
6	—	0.250	0.100	0.120	55	3.2	1.5	4.7	1.7
	+	0.250	0.100	0.120	55	4.7	1.5	5	1.7

Sporulation Studies — P. chrysogenum produced spores within 3—4 days on potato-glucose agar, and from such 5—9 day old cultures sufficient spores for inoculating small flasks could usually be obtained. However, the quantity of spores produced showed considerable variation, as indicated by the ease with which spores could be removed from agar cultures by an inoculating needle. To obtain spores from agar cultures in quantities sufficient for large-scale inoculations involved too much labor. A light, thin mycelium which produced spores readily and plentifully on a liquid medium was desired. For this purpose, glucose solutions containing various nutrient salts were utilized (Table 3). Three nutrients were varied along triangular coördinates with and without the addition of $FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$. In most cases the presence of $FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$ stimulated sporulation, but in series 4 such an effect was not noted. In series 4 satisfactory sporulation took place when the cultures were 4 days old; the mats were thin and fragile and small pieces could be used for inoculation of culture flasks, owing to the ease with which the spores shattered from the mat fragments. The sporulation flasks were shaken vigorously, and the fragmented mycelium and spore suspension thus obtained were used for the inoculation of larger volumes of solution. In the absence of $FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$, best sporulation was obtained when solutions containing 20% glucose were employed. The thin mats which developed in all cases indicated that such a large quantity of sugar was unnecessary for energy requirements. The data presented in Table 4 show that best results were

again obtained with 20% glucose solution. The presence of some impurities in the glucose seems to be a contributing factor. Thus, a 10% solution may afford a concentration of the essential elements below the threshold value. Successive generations, even on 20% glucose solutions, showed a gradual decrease in both sporulation and vegetative vigor. It was found that such losses could be prevented completely by inoculation of the sporulation cultures from potato glucose agar slant cultures (agar 20.0 gm., glucose 40 gm., filtered liquor from 200 gm. cooked potatoes, distilled water to make 1 liter). Other salt solutions may be satisfactory, and a careful study of accessory salts and organic compounds might make possible the use of 5% glucose solutions. However, the procedure developed gives satisfactory results under the conditions at present required for culture. Recently it has been found that the addition of about 0.20% agar to the salt-glucose medium insures more uniform sporulation, owing, apparently, to the increased viscosity of the solution, thus making possible a more even distribution of the dry and floating spores over the liquid surface. Temperatures over 30° inhibit sporulation.

Table 4. Effect of Sugar Concentration on Sporulation of P. chrysogenum 5034.11. Culture size — 50 cc. solution in 200 cc. Erlenmeyer flask.

Nutrients, gm./L.				Culture Appearance Scores					
				4 days		8 days		12 days	
Comm. Glucose	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	KH_2PO_4	NH_4NO_3	Spores on Mat	Mat Bulk	Spores on Mat	Mat Bulk	Spores on Mat	Mat Bulk
55	0.025	0.030	0.250	0.7	1.5	1	1.5	1.5	1.5
110	0.025	0.030	0.250	2.5	1.5	3	1.7	3.0	2.0
220	0.025	0.030	0.250	4.5	1.5	5	1.7	4.0	2.5

Salt Requirements.

The results of preliminary experiments, recorded in Table 2, indicated that good yields of gluconic acid could be obtained with a salt solution containing $NaNO_3$, $MgSO_4$, and KH_2PO_4. The optimum concentrations of these salts first were studied according to the triangle method devised by Schreiner and Skinner (8), which affords a rapid and convenient means of investigating the three-phase system. The results of the first experiment are presented in Table 5 and Figure 1. The yield of gluconic acid is sharply decreased in the presence of less than 3.0 gm./L of $NaNO_3$. The concentrations of $MgSO_4$ and KH_2PO_4 may be varied over a rather wide range without materially affecting the yield; Note 7, 8, 9 and 10. The dry weight of the mats, development of a yellow color in the fermented liquor, and folding of the mats vary in approximately the same degree as the acid production with the $NaNO_3$ concentrations.

Five nitrogen salts supplied in quantities equivalent on the basis of total nitrogen, in five different concentrations, were compared in solutions containing 25.4% commercial glucose. A better comparison of these salts was possible when the sugar was not a limiting factor, as frequently is the case with a 15% sugar solution. The results, presented in Table 8, indicate that $NaNO_3$, KNO_3, and $Ca(NO_3)_2$ are approximately of equal value as nitrogen sources for this organism. Sporulation was heavy on the low concentrations and showed a tendency to be less on the higher concentrations. The

Table 5. Responses of P. Chrysogenum to Variations of three Salts Along Triangular Coordinates.
Comm. glucose = 22% (15 gms. pure glucose per culture).
Culture age = 11 days.
Data based on averages of triplicalte cultures.

Culture Series Nos.	Salt Variations gms./L. $Na \cdot NO_3$	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	KH_2PO_4	Culture Appearance Scores Spores on Mat	Mat folding	Liquid yellow	Gluconic Acid gms.	Dry Wt. of Mats gms.	Glucose Consumed gms.	Per Cent Yield of Acid Based on Glucose present	Glucose Consumed
1	0.50	0.15	0.15	3.7	1	0	0.75	0.156	1.7	4.6	40.5
2	1.00	0.25	0.15	3.7	1.5	0	1.6	0.289	3.4	9.8	43.2
3	1.00	0.15	0.25	3.7	1.5	1	1.6	0.312	3.4	9.8	43.2
4	2.00	0.50	0.15	4.7	2	1	5.3	0.619	8.0	32.4	60.9
5	2.00	0.25	0.25	3.7	2	1	5.0	0.701	8.1	30.6	56.7
6	2.00	0.15	0.50	3.2	2.5	1	4.7	0.672	8.2	28.7	52.6
7	3 00	1.00	0.15	3.2	3	2	8.0	0.945	12.4	49.0	59.3
8	3.00	0.50	0.25	3 2	3.5	2	8.3	0.884	13.5	50.8	56.5
9	3 00	0.25	0.50	3.2	4	2	8.7	1.030	13.9	53.3	57.5
10	3.00	0.15	1.00	2.7	4	2	8.7	1.060	13.6	53.5	58.8

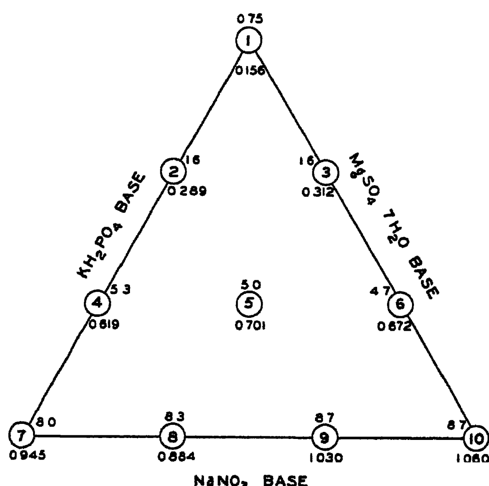


Fig. 1. Responses of P. Chrysogenum to variations of three salts along triangular coordinates. The numbered circles show the position of the culture series. The number above the circle represents the production of gluconic acid in grams and the number below the circle shows the dry mat weight in grams, see Table 5.

mat weights, as in the experiment above described, were nearly proportional to the nitrogen concentration. The gluconic acid yield of 85%, based on sugar used, with 2 grams of $NaNO_3$ per liter, is one of the highest yields obtained with surface cultures. However, the actual gram yield of gluconic acid is greater in the 3.0 gm./L. $NaNO_3$ cultures, and chiefly for this reason, a 3.0 gm./L. $NaNO_3$ concentration was superior under these conditions. The presence of traces of $FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$ may be beneficial in preventing excessive curling of the mats. This phase of the nutrient problem will be discussed later.

The 2 ammonium salts were unsatisfactory, especially NH_4Cl, which was unquestionably inhibitory in the higher concentrations. NH_4NO_3 supports a fair vegetative growth and acid production, but is judged inferior to any of the alkali nitrate salts tested.

P. chrysogenum was cultured for 8 days on 28 different combinations of KH_2PO_4 and $MgSO_4$, as shown in Table 6 and Figure 2. The best weight yields of gluconic acid occurred in those cultures containing concentrations of 0.250—0.500 gm./L. of either $MgSO_4.7\ H_2O$ or KH_2PO_4.

Table 6. Responses of P. Chrysogenum to Different Concentrations of $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ and KH_2PO_4.

Commercial glucose = 22% (15.0 gm. pure glucose per culture).
$NaNO_3$ = 3 0 gm./L.
Culture age = 8 days.
Data based on averages of triplicate cultures.

Culture Series Nos.	Salt Variations gm./L. $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	Salt Variations gm./L. KH_2PO_4	Culture Appearance Scores: Spores on Mats	Culture Appearance Scores: Mat Folding	Gluconic Acid Grams	Dry Wt. of Mats Grams	Glucose Consumed Grams	Per Cent Yield of Acid Based on Glucose Present	Per Cent Yield of Acid Based on Glucose Consumed
1	0.125	0.125	2.5	2	8.2	0.530	11.1	50 2	67.8
2	0.250	0.125	3.7	2	9.4	0.696	12.1	57.6	71.4
3	0.500	0.125	4	3.2	8.8	0.660	11.8	53 9	68.5
4	1.00	0.125	5	3.2	8.2	0.569	11.2	50.2	67.2
5	0.125	0.250	0	2.5	8.9	0.816	12.4	54.5	65.9
6	0.250	0.250	1	4	9.8	0.876	13.5	60.0	66.7
7	0.500	0.250	1	4	9.7	0.789	13.2	59.4	67.5
8	1.00	0.250	1.2	4	9.5	0.678	13.1	58.2	66.7
9	0.125	0.500	1	3	9.2	0.868	13.2	56.4	64.1
10	0.250	0.500	1	4	9.4	0.846	13.4	57 6	64.5
11	0.500	0.500	1	4	9.5	0.761	13.0	58 2	67.1
12	1.00	0.500	1	4	8.8	0.692	12.7	53.9	63.7
13	2.00	0.500	4	3.5	7.5	0.636	11.4	46.0	60.5
14	3.00	0.500	4	3.7	6.2	0.658	9.5	38 0	60.0
15	0.125	1.00	1	3.7	9.1	0.874	12.9	55.7	64.7
16	0.250	1.00	1	3.7	9.3	0.801	13.4	56.9	63.8
17	0.500	1.00	1	4.5	9.2	0.760	12.8	56.4	66.0
18	1.00	1.00	1	4.5	8.1	0.645	11.8	49.6	63.1
19	2.00	1.00	4	4.5	6.5	0.646	10.3	39.8	58.0
20	3.00	1.00	4.5	2.7	6.2	0.638	9.4	37.9	60.6
21	0.500	2.00	1	4	8.8	0.798	12.6	53.9	64.1
22	1.00	2.00	1.5	4	8.2	0.744	12.1	50.2	62.2
23	2.00	2.00	4	3	6.6	0.733	11.1	40.4	54.6
24	3.00	2.00	4.5	3	6.4	0.854	10.8	39.2	54.4
25	0.500	3.00	4.5	3	8.7	0.838	12.9	53.3	62.0
26	1.00	3.00	4.5	3	7.6	0.829	12.2	46.5	57.2
27	2.00	3.00	4.5	2.7	6.4	0.834	10.8	39.2	54.4
28	3.00	3.00	4.5	2	5.6	0.843	10.4	34.3	49.5

Concentrations of more than 1.00 gm./L. of $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ caused a greater decrease in yields than did corresponding concentrations of KH_2PO_4. A partial duplication of this experiment was carried out in larger flasks and volumes of solution, but with nearly the same surface area-volume ratio as in the small flasks (See Table 7). The responses of P. chrysogenum in these large flasks were in close agreement with those of small flask cultures. Good acid yields occurred in the low salt cultures (0.125 gm./L. of $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ and KH_2PO_4). In experiments reported in another paper (4), in which the surface area-volume ratio was much less, very good yields in submerged cultures were obtained with the following salt concentrations: $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0.125 gm.; KH_2PO_4, 0.150 gm.; and $NaNO_3$, 3.0 gm./L. However, with flask cultures having a surface area-volume ratio of 0.4 to 0.5, the following nutrient appears to be near the optimum: $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0.250 gm.; KH_2PO_4, 0.300 gm.; and $NaNO_3$, 3.00 gm./L. with a 20—25% solution of commercial glucose.

KH$_2$PO$_4$ Concentrations-Grams per Liter	MgSO$_4$ 7 H$_2$O Concentrations-Grams per Liter: 0.125	0.250	0.500	1.00	2.00	3.00
0.125	1 8.2 0.530	2 9.4 0.696	3 8.8 0.660	4 8.2 0.569		
0.250	5 8.9 0.816	6 9.8 0.876	7 9.7 0.789	8 9.5 0.678		
0.500	9 9.2 0.868	10 9.4 0.846	11 9.5 0.761	12 8.8 0.692	13 7.5 0.636	14 6.2 0.658
1.00	15 9.1 0.874	16 9.3 0.801	17 9.2 0.760	18 8.1 0.645	19 6.5 0.646	20 6.2 0.638
2.00			21 8.8 0.798	22 8.2 0.744	23 6.6 0.733	24 6.4 0.854
3.00			25 8.7 0.838	26 7.6 0.829	27 6.4 0.834	28 5.6 0.843

Fig. 2. Responses of P. chrysogenum to different concentrations of $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ and KH_2PO_4. The numbered squares show the position of the culture series. The upper number in each square represents the production of gluconic acid in grams, and the lower number shows the dry mat weight in grams, see Table 6.

Table 7. Responses of P. chrysogenum to Different Concentrations of $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ and KH_2PO_4.

Commercial glucose = 22.2% (132 gm. pure glucose per culture).
$NaNO_3$ = 3.0 gm./L.
Culture volume = 600.0 cc. (3-liter Currie flask).
Culture age = 9 days.
Data based on averages of duplicate cultures.

Cult. Series Nos.	Salt Variations gm./L.		Culture Appearance Scores		Glu-conic Acid	Dry Wt. of Mats	Glu-cose Con-sumed	Per Cent Yield of Acid, Based on	
	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	KH_2PO_4	Spores on Mats	Mat Fold-ing	Grams	Grams	Grams	Glucose Present	Glucose Consumed
1	0.125	0.125	2	0	91.3	3.805	109.2	62.9	76.8
2	0.250	0.250	2.5	3	98.0	5.150	116.7	67.8	77.1
3	0.500	0.250	2.5	3.5	73.0	4.438	92.3	50.3	72.6
4	0.250	0.500	2.5	2.5	77.2	5.070	102.0	53.2	69.6
5	1.00	1.00	3.	3	71.4	5.828	95.7	49.2	68.6

Accessory Salts.

There was a possibility that the addition of some accessory compounds to the nutrient solution might modify the growth responses and acid production. In different culture series variations were noted in the amount of sporulation and the folding of the mats. In Table 9 the presence of $FeCL_3$ and $Mn(NO_3)_2$ did prevent excessive curling and folding of the mats, which in some cases seemed responsible for a noticeable decrease in acid yields. The first step in the study of salts other than those in the standard nutrient solution was undertaken by substituting tap water for distilled water in the preparation of the culture solutions. The exact composition of the tap water was not known, but the predominant elements present in the ash obtained by evaporation and ignition were Ca, Si, Fe, Al and Mg, according to composite mineral analyses reported by the Filtration Plant Laboratory of the Water Department of the District of Columbia. Four culture series were grown on M and ½ M salts, each with distilled water and tap water. The presence of tap water decreased the production of gluconic acid in both salt solutions, but not to such a marked extent in the ½ M as in

Table 8. Responses of P. chrysogenum to Five Nitrogen Sources.
Salts = KH_2PO_4, 0.300 gm. and $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.250 gm./L.
Commercial glucose = 25.4% (19.0 gm. pure glucose per culture).
$FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$, each 2.0 mg./L. in alkaline nitrate cultures.
Culture age = 9 days.
Data based on averages of triplicate cultures.
All nitrogen sources are equivalent on basis of total nitrogen.

Nitrogen Salts gm./L.	Culture Appearance Scores		Gluconic Acid	Glucose Consumed	Dry Wt. of Mats	Per Cent Yields of Acid, Based on	
	Spores on Mats	Mat Folding	Grams	Grams	Grams	Glucose Present	Glucose Consumed
$NaNO_3$ — 1.00	5	0	2.0	3.7	0.284	9.7	49.6
2.00	3	1	13.2	14.3	0.649	63.8	84.9
3.00	3.7	2	13.6	17.6	0.956	65.7	71.0
4.00	2.2	1	12.7	16.9	1.111	61.4	69.1
5.00	2	1	11.1	15.7	1.106	53.6	65.0
KNO_3 — 1.189	5	0	2.9	5.0	0.389	14.0	53.3
2.378	4.2	1	12.4	15.5	0.666	60.0	72.6
3.567	4.2	1	13.2	17.8	0.928	63.8	68.1
4.756	4	1	11.5	17.1	1.340	55.6	61.8
5.945	3.8	1	11.3	16.9	1.153	54.7	61.4
$Ca(NO_3)_2$ — 1.389	5	0	3.5	5.5	0.309	16.9	58.5
2.778	3	1	10.8	12.8	0.588	52.2	77.5
4.167	3.5	1	11.7	15.4	0.942	56.6	69.8
5.556	3	1.2	13.1	17.1	1.045	63.3	70.4
6.945	4.7	1.2	10.7	16.0	1.156	51.7	61.4
NH_4NO_3 — 0.470	5	0	0.8	2.4	0.280	3.7	30.6
0.940	4	0	1.5	3.1	0.462	7.2	44.5
1.410	0	1	5.3	7.0	0.602	25.6	69.6
1.880	0	1	8.4	11.0	0.799	40.6	70.0
2.350	0	1	8.4	11.8	0.909	40.6	65.4
NH_4Cl — 0.630	0	0	0.0	1.2	0.218	—	—
1.260	0	0	0.8	1.3	0.187	3.7	56.6
1.890	0	0	0.9	—	0.154	4.3	6
2.520	0	0	1.1	—	0.155	5.3	—
3.150	0	0	1.0	—	0.146	4.7	—

the M solutions. Sporulation was heavy on tap water and light on distilled water. The folding of the mats was greatly inhibited on tap water. An excess of salts in the M solution plus tap water might explain this behavior, since here and in other experiments fairly good yields of acid have been obtained on regular ½ M nutrient solutions.

Although the results with tap water were not encouraging, 8 salts ($Al_2K_2(SO_4)4 \cdot 24\,H_2O$, $NiSO_4$, KCl, $CaCl_2$, $FeCl_3$, $Mn(NO_3)_2$, $ZnSO_4$, and $CuSO_4$) were supplied separately in a concentration of 20 mg./L. The first 6 salts showed no toxic action and no significant increases in acid yields over the check cultures. The $FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$ definitely inhibited the folding of the fungus mats. $ZnSO_4$ stimulated mat growth but decreased the acid yields ($ZnSO_4$ acid yield = 22.6%, as compared with a 65.9% yield of the checks — per cent yields based on the sugar consumed). $CuSO_4$ inhibited mat growth. Later a partial duplication of the experiment described above was made, using ½ M and M salt solutions with identical results.

The commercial glucose employed in these experiments contained approximately 0.007% ash, made up of various elements, chief of which was iron. In other experiments with Aspergillus niger, conclusive evidence has been obtained to show that variations occur in the quality of the various bag lots of commercial glucose. Hence, some variation of acid yield and mat folding with P. chrysogenum on solutions prepared at different times may be caused by variations in the quantity of impurities present in the glucose. As a partial precaution against such variations, check cultures always have been repeated whenever a different lot of glucose was used, or when there was any difference in the age or source of the inoculum.

Table 9. Responses of P. chrysogenum to $FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$ in Presence of Commercial, and C. P. Glucose.

Glucose concentration = 20% (15.0 gm./culture).
$FeCl_3$ or $Mn(NO_3)_2$ = 20 p.p.m.
Salts = KH_2PO_4, 0.300; $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0.250, and $NaNO_3$, 3.0 gms./L.
Culture age = 11 days.
Data based on average of 4 cultures per series.

Glucose Present	$FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$	Culture Appearance Scores		Gluconic Acid	Glucose Consumed	Dry Wt. of Mats	Per Cent Yield of Acid Based on	
		Spores on Mat	Mat Folding	gms.	gms.	gms.	Glucose Present	Glucose Consumed
Commercial	O	4.0	5	10.3	13.4	0.865	63.2	70.8
Commercial	Fe	4.7	1.7	10.6	13.6	0.896	65.0	71.7
Commercial	Mn	5.0	0.7	8.1	11.9	1.046	49.6	62.5
C. P.	O	3.0	5.0	8.0	11.0	0.641	49.0	66.8
C. P.	Fe	2.0	2.7	10.8	13.6	0.792	66.2	73.0
C. P.	Mn	5.0	0.7	8.2	12.2	1.009	50.1	61.7

Aspergillus flavus, which produces kojic acid from glucose (5), was cultured in the same series, along with P. chrysogenum, on 3 different grades of glucose. Analyses showed that the commercial glucose contained the most ash, especially iron, while C. P. glucose contained less ash than the U. S. P. X. glucose. The yields showed that both organisms made similar responses to these grades of glucose, viz., best acid production

and heaviest mats on the commercial glucose. These results suggest that some of the impurities are beneficial, since much lower yields were obtained on the C. P. glucose. Kojic acid yields on commercial, C. P., and U. S. P. X. glucose (15.0 gm. glucose per culture) were respectively 4.7, 2.4 and 4.5 gm. The gluconic acid yields were 10.6, 7.5 and 9.1 gm., respectively.

The effect of the addition of $FeCl_3$ and $Mn(NO_3)_2$ to commercial and C. P. glucose was next studied. The addition of $FeCl_3$ to commercial glucose again did not significantly increase the yield of gluconic acid, while with C. P. glucose it had a definite beneficial action (Table 9). Addition of Mn decreased the yield of acid from commercial glucose and stimulated mat formations in the case of both sugars, as indicated by the mat weights. The addition of accessory salts to commercial glucose did not prove especially beneficial, but the presence of Fe and Mn did check an excessive folding of the mats. If a sugar of greater purity, such as C. P. glucose is employed, the addition of Fe causes an increase in the acid yield. Further work with C. P. glucose might reveal other elements which would be effective in increasing the acid yields.

Table 10. Responses of P. chrysogenum to Different Concentrations of Commercial Glucose.

Salts = $NaNO_3$, 3.0 gms., KH_2PO_4, 1.00 gms. and $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.500 gms./L. Data based on average of triplicate cultures.

Glucose Present		Culture age days	Culture Appearance Scores		Glu-conic Acid	Dry Wt. of Mats	Glu-cose Con-sumed	Per Cent Yields of Acid Based on	
Per cent	Gms. /cult.		Spores on Mat	Mat Folding	gms.	gms.	gms.	Glucose Present	Glucose Consumed
10	7.5	6	1.2	2	3.8	0.744	6.7	46.5	52.0
15	11.2		1.7	4	5.5	0.750	8.2	45.1	61.6
20	15.0		1.7	4	8.9	0.773	11.7	54.5	69.9
25	18.8		2.5	3	10.4	0.762	13.3	50.9	72.0
30	22.5		3.2	2	11.5	0.769	14.4	47.0	73.3
10	7.5	9	1	2	4.0	0.759	7.4	49.0	49.6
15	11.2		1.2	5	6.0	0.769	9.0	49.2	61.2
20	15.0		1.2	4	10.2	0.780	14.2	62.5	66.0
25	18.8		2	3.2	12.5	0.796	16.4	61.1	70.0
30	22.5		3.2	3	12.8	0.819	17.2	52.2	68.4
10	7.5	12	1	3	3.8	0.724	7.4	46.5	47.2
15	11.2		1.2	5	6.5	0.870	10.1	53.3	59.1
20	15.0		1.2	4	10.1	0.873	14.8	61.9	62.8
25	18.8		2	3.2	12.7	0.880	17.3	62.0	67.4
30	22.5		3.2	3	14.0	0.876	19.1	57.1	67.4

Glucose solutions in 5 different concentrations were placed in the small flasks with fairly high concentrations of KH_2PO_4 and $MgSO_4$ and were inoculated. Triplicate cultures were harvested at the end of 6, 9, and 12-day incubation periods, as shown in Table 10. The most pronounced mat folding and wrinkling developed in the 15% and 20% glucose cultures. Sporulation was most favored by the 30% concentration. The mat weights were not greatly influenced by the sugar concentration, which offers a partial explanation of the lower percentage yields, based on sugar consumed, in a 10% solution as compared with 25% or 30% solutions. The speed of the oxidation is nearly proportional to the quantity of sugar in

direct contact with the mat. In other words, 7 grams of glucose can be more quickly assimilated by the mat from a 25% solution than from a 10% solution, owing to the greater diffusion gradient. There is evidence that 30% glucose solutions are slightly inhibitory. The maximum yield, based on sugar originally present, was obtained in 9 days on the 20% solution. It is believed that the optimum lies between the 20% and 25% concentrations of glucose.

Table 11. Effect of Surface Area-Volume Ratio on Production of Gluconic Acid.
Commercial glucose = 24.7%.
Salts = $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.250 gm./L.
KH_2PO_4, 0.300 gm./L.
$NaNO_3$, 3.00 gm./L.
Special culture bottles (see text).
Surface area = 59.5 sq. cm.
Data based on averages from duplicate cultures.

Volume of Medium cc.	Surface Area-Volume Ratio	Culture Age Days	Gluconic Acid Grams	Dry Wt. of Mats Grams	Glucose Consumed Grams	Gluconic Acid/cc. of Orig. Solutions Grams	Gluconic Acid/cm^2 of Mat Grams	Per Cent Yield of Acid Based on Glucose Present	Glucose Consumed
75	0.793		11.0	0.745	12.8	0.146	0.185	54.6	78.9
125	0.476	6	14.6	1.262	18.2	0.117	0.246	43.4	73.7
175	0.340		15.2	1.273	18.2	0.087	0.256	32.3	76.6
225	0.264		15.6	1.281	18.5	0.069	0.262	25.8	77.4
Sugar per Culture Grams	Depth of Medium cm.		11.7	0.959	14.7	0.156	0.197	58.1	73.2
		8	17.1	1.345	22.4	0.137	0.288	50.8	70.1
			18.9	1.419	24.2	0.108	0.318	40.2	71.8
			19.3	1.695	25.3	0.086	0.325	32.0	70.1
18.5	1.3		12.5	1.094	17.1	0.167	0.210	62.0	67.2
30.9	2.1	12	19.9	1.495	27.9	0.159	0.335	59.1	65.4
43.2	2.96		23.7	1.624	31.8	0.136	0.398	50.4	68.5
55.5	3 8		25.8	2.127	35.2	0.115	0.434	42.7	67.3

A study was made of the effect of the surface area-volume ratio on the rate of gluconic acid production. Special 1-liter, straight walled culture bottles were employed with 4 different volumes or depths of culture solutions as the only variables. Harvests were made at 6, 8, and 12-day intervals. The results and calculations are presented in Table 11. The percentage yields, based on sugar consumed, are almost identical in each series, even though the surface area-volume ratios are quite different. These percentage yields show a definite decrease in the older cultures. This change is probably caused by 2 factors; first, more carbon is consumed in respiration, and second, owing to a decrease in the available supply of glucose, some of the gluconic acid is utilized as a food source. The percentage yields, based on the sugar originally present, and the acid produced per cc. of original solution, vary almost directly with the surface areavolume ratio, especially during the first 6 days. The production of gluconic acid per square cm. of mat varies indirectly with the depth of the solution throughout the entire period of incubation. The greater weight of mat per unit area and the greater total supply of nutrients available may account for this condition. The desired depth of solution for surface mat cultures depends upon the objective, since the greater the depth of the nutrient

medium the longer the time required to obtain a 50—60% yield, based on the sugar present.

Only once has a stock culture shown a definite loss in gluconic acid producing power. Microscopical examination did not reveal the presence of a foreign organism. A few bacterial contaminations of the agar slant stock cultures have occurred, which caused poor sporulation and unsatisfactory inoculation material. Such bacterial contaminations make only a slight change in the appearance of the mature stock culture, and it is necessary occasionally to prepare dilution agar plate cultures to detect the presence of bacteria.

A regular procedure has been adopted of placing a transfer from the current stock in cold storage at least once a month to ascertain the stability of the fungus. Six such cultures, having a common monospore origin and ranging in age from 5 months to 2 weeks, were taken from cold storage, placed on fresh sporulation media, and then used 6 days later to inoculate culture media containing 20% glucose. The incubation period was 9 days. The minimum, maximum, and average percentage yields of gluconic acid, calculated on sugar originally present, were respectively, 58.8%, 60.5%, and 59.9%. Thus, during a storage period of 5 months and through a series of 7 spore generations, there was no loss of oxidizing power. Almost 3 years have elapsed since the original culture was tested, and during that period more than 100 spore generations have been cultured and the stock cultures at the present time are in no way inferior to the original cultures in their ability to produce gluconic acid.

The authors wish to express their appreciation to G. E. Ward and P. A. Wells for assistance rendered in the course of this investigation.

Summary.

1. P. chrysogenum (5034.11) was found to have a greater capacity to produce gluconic acid than any of more than 50 other Penicillium species studied.

2. Spores for inoculation purposes are readily obtained by culturing this fungus on a special medium, low in mineral nutrients.

3. In culture flasks having a surface area-volume ratio of 0.4 to 0.5, the following nutrient solution was found to be near optimum: $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 0.250 gm.; KH_2PO_4, 0.300 gm.; and $NaNO_3$, 3.00 gm./L., with a 20—25% solution of commercial glucose. Under these conditions, around 60% of the glucose present is oxidized to gluconic acid in a culture period of 8—10 days.

4. When nutrients of high purity are utilized, the addition of small quantities of $FeCl_3$ stimulates acid production and vegetative growth.

5. The optimum sugar concentration is not sharply defined but is apparently between 20% and 30%.

6. The time required to utilize all the sugar in a given volume varies indirectly with the surface area-volume ratio.

7. During a 3-year period no loss of gluconic acid producing ability has been observed in cultures of P. chrysogenum (5034.11).

Literature Citations.

1. Bernhauer, K., Die oxydativen Gärungen. Berlin (Julius Springer) 1932. 196 S. — 2. Boutroux, L., Sur une fermentation nouvelle du glucose. (Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. T. 91. 1880. p. 236—238.) — 3. May, O. E., Herrick, H. T., Moyer, A. J., and Hellbach, R., Semi-plant Scale Production of Gluconic Acid by Mold Fermentation. (Ind. Eng. Chem. Vol. 21. 1929. p. 1198—1203, illus.) — 4. May, O. E., Herrick, H. T., Moyer, A. J., and Wells, P. A., Production of Gluconic Acid by Submerged Molds Growths Under Increased Air Pressure. (Ind. Eng. Chem. Vol. 26. 1934. p. 575—578.) — 5. May, O. E., Moyer, A. J., Wells, P. A., and Herrick, H. T., The Production of Kojic Acid by Aspergillus flavus. (Journ. Amer. Chem. Soc. Vol. 53. 1931. p. 774—782.) — 6. Molliard, M., Sur une nouvelle fermentation acide produite par le Sterigmatocystis nigra. (Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. T. 174. 1922. p. 881—883.) — 7. Raistrick, H., et al., Studies in the Biochemistry of Microorganisms. Part XVII. The Products of Glucose Metabolism by Various Species of Fungi. (Phil. Trans. Roy. Soc. London. Vol. 220. 1931. Series B, p. 348—353.) — 8. Schreiner, O., and Skinner, J. J., The Triangle Ssytem for Fertilizer Experiments. (Journ. Amer. Soc. Agron. Vol. 10. 1918. p. 225—246, illus.) — 9. Takahashi, T., and Asai, T., On Gluconic Acid Fermentation. Part III. On Bacterium Hoshigaki var. glucuronicum, I, II, and III, nov. spec. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 87. 1933. S. 385—412.)

Nachdruck verboten.

Zur Isolierung des bulgarischen Milchsäurelangbazillus.

[Aus dem Pharmakologischen Institut mit therapeutischer Klinik der Universität Sofia. Direktor Prof. Dr. Wl. Alexieff.]

Von **B. Jurukoff**, Assistent.

Mit 1 Abbildung im Text.

Durch die Arbeiten von Grigoroff im Laboratorium Massols in Genf und jene von Cohendy und Michelson unter Leitung von Metschnikoff im Pasteur-Institut, Paris, wurden in der bulgarischen Sauermilch, auch als Joghurt — inde nomen — bekannt, Milchsäurelangbazillen festgestellt. Lürssen und Kühn beschrieben zwei verschiedene „Arten", welche sie als B. bulgaricus und Körnchenbazillus bezeichnet haben. In der bekannten Einteilung der Milchsäurelangbazillen von Orla-Jensen wird der erste als Thermobacterium bulgaricum, der zweite als Thermobacterium Joghurti benannt. Lehmann und Neumann sprechen von Thermobacterium bulgaricum nach Orla-Jensen und von Thermobacterium granulosum für den Körnchenbazillus von Lürssen und Kühn.

Schon Kuntze und andere Forscher bezweifelten aber die Verschiedenheit dieser Bakterien untereinander und betrachteten vielfach den Bac. bulgaricus als eine Varietät des Körnchenbazillus, welche keine Volutingranula enthält. Auch nach Untersuchungen von bulgarischen Forschern (Markoff, Kantardjieff) besteht die Unterscheidung von Thermobact. bulgaricum und Thermobact. granulosum zu unrecht. Es handelt sich auch nach eigenen Untersuchungen um ein und dieselbe Bakterienform, für welche Markoff den Namen Bacterium bulgaricum gebraucht, kein besonderes Gewicht auf den Zusatz „thermo" legend. Auch ich folge in der Benennung Markoff. Er betrachtet das

Bact. bulgaricum als den artspezifischen Erreger des Joghurts. Hiermit stimmen überein Kantardjieff und manche anderen Forscher. Meine persönlichen Untersuchungen sprechen auch dafür.

Joghurt ist nicht nur als eines der besten diätetischen Milchpräparate bekannt, sondern wird auch in den letzten Jahren zur Herstellung von wirksamen Präparaten zur parenteralen Einverleibung nach Prof. Alexieff benutzt (Alexieff, Nikoloff).

Bei diesen Arbeiten war es meine Aufgabe, immer frische Stämme von Bact. bulgaricum herauszuzüchten und zur Verfügung zu stellen. Mit alten Stammkulturen wird bekanntlich kein gutes Präparat erzeugt.

Es sind zwar verschiedene Methoden zur Isolierung des Bact. bulgaricum aus Joghurt angegeben, aber die meisten in der Literatur als elektiv angeführten Nährböden sind nach Markoff und nach persönlichen Erfahrungen nicht geeignet zur schnellen Isolierung und Kultivierung der Mikroflora des originellen Joghurts. Markoff empfiehlt zur Isolierung und zu oberflächlichen Kulturen einen hochprozentigen Peptonmilchzucker-Molkenagar[1]). Auf diesem Nährboden wachsen auch die Milchsäurestreptokokken. Die Herstellung des Nährbodens ist aber nicht einfach, sehr kostspielig und zeitraubend und nur gleich nach der Herstellung zu gebrauchen.



Abb. 1.

Um diesen Nachteilen zu entgehen und eine schnelle Isolierung von Bact. bulgaricum zu ermöglichen, habe ich Blut-, Ascites-, Serum- und Glyzerin-Nährböden versucht. Meine Arbeiten erstrecken sich hauptsächlich auf Blutagar, Kochblutagar, Ascitesagar, Serumagar, Glyzerinagar, Blutglyzerinagar, Kochglyzerin-Blutagar, Ascites- und Serum-Glyzerinagar.

Die besten Ergebnisse wurden mit den glyzerinhaltigen Nährböden erreicht. Auf den anderen Nährböden wächst zwar Bact. bulgaricum schon nach 24 Std., aber das Wachstum von anderen Mikroorganismen, welche zu der regelmäßigen oder zufälligen Mikroflora des Joghurts gehören, wird nicht gehemmt. Das Wachstum von Bact. bulgaricum auf diesen Nährböden ist dabei kein üppiges und mikroskopische Präparate aus den gewachsenen Kolonien, nach Neißer gefärbt, zeigen keine oder nur spärliche Volutingranula-Bildung. Es treten bald, insbesondere auf den serumhaltigen Nährböden ausgesprochene Degenerations-Erscheinungen auf.

---

[1]) Dieser besteht aus Mischung A und B und wird folgendermaßen hergestellt: Es wird Molke gewonnen durch Behandlung von Milch, die auf 40° erwärmt und innerhalb 30 Min. mit Labferment „Beyer" versetzt wird, wobei Gerinnung erfolgt. Das Produkt wird binnen ca. 15 Min. auf 70° erwärmt und nach dem Erkalten wieder filtriert. Das Filtrat wird erneut erwärmt, durch 10% Sodalösung neutralisiert und im Dampftopf an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 15 Min. sterilisiert. Die so gewonnene Molke wird zu 3% Molkenagar verarbeitet (Mischung A). Zu 100 ccm dieses verflüssigten und auf 70° abgekühlten Molkenagars werden 30 ccm der auch auf 70° erwärmten Mischung B zugesetzt. Die Mischung B besteht aus 30 ccm Wasser, 10 g Pepton und 5 g Milchzucker und wird 2 Std. lang im Dampftopf sterilisiert. Der so hergestellte hochprozentige Peptonmilchzucker-Molkenagar wird in Petrischalen und Röhrchen ausgegossen und ist gleich nach der Herstellung zu gebrauchen. Man legt auf diesem Nährboden Oberflächenkulturen an, die bei 37° gebrütet werden.

Unter den glyzerinhaltigen Nährböden erwies sich als bestens geeignet der Kochglyzerin-Blutagar, auf welchem schon nach 8—12 Std. 1—2 mm große unregelmäßig rundliche, flache, oberflächliche Kolonien fast in Reinkultur gewachsen sind. Die Kolonien zeigen ein sehr schnelles Wachsen und erreichen nach 24—48 Std. einen Durchmesser von ½—1 cm, wobei benachbarte Kolonien sehr bald zusammenfließen. Abb. 1 zeigt eine typische Kolonie von Bact. bulgaricum auf Kochglyzerin-Blutagar nach 24stünd. Bebrütung bei 37° (Vergroßerung 8fach). Bei 90facher Vergroßerung zeigt der Rand der Kolonie ein haarartiges, zum Teil lockiges Aussehen mit langen Ausläufern. Das Innere der Kolonie ist kompakt und zum Teil granuliert. Volutingranula-Bildung in mikroskopischem Präparat, nach Neißer gefärbt, ist sehr stark ausgeprägt.

Auf Glyzerinagar ist das Wachstum des Bact. bulgaricum ein schwächeres und langsameres, auf Ascites- und Serum-Glyzerinagar sind oft Degenerationsformen zu beobachten, und es ist die Volutingranula-Bildung nicht so ausgeprägt wie auf den blutglyzerinhaltigen Nährboden. Es wird der Kochglyzerin-Blutagar dem Blutglyzerinagar gegenüber bevorzugt, wegen der zum Arbeiten (Impfen des Nährbodens, Abnehmen von Kolonien) geeigneteren Konsistenz des Kochglyzerin-Blutagars. Sonst sind Blutglyzerinagar und Kochblut-Glyzerinagar als gleichwertig zu betrachten.

Was den Glyzeringehalt dieser Nährböden anbetrifft, hat es sich bei meinen Versuchen herausgestellt, daß man einem ca. 4proz. Glyzerinnährboden den Vorzug geben muß. Somit empfehle ich zur Isolierung des Bact. bulgaricum aus Joghurt-Proben als geeignetsten Nährboden einen Kochglyzerin-Blutagar, der folgendermaßen hergestellt wird:

60 g steriles defibriniertes Blut wird mit 40 g doppeldestilliertem Glyzerin versetzt und an kuhlem Orte aufbewahrt. Vor Gebrauch wird von diesem Glyzerinblutgemische 10% kochendem Nahragar zugesetzt, durch Schwenken gut gemischt und in Petrischalen ausgegossen. Der Nahrboden hat ein schokoladeartiges Aussehen und eine zum Arbeiten sehr geeignete Konsistenz. Die Petrischalen werden oberflachlich mit der Joghurtprobe beimpft und bei 37—38° bebrutet.

Zusammenfassung.

Es wird eine sehr praktische Methode zur leichten und schnellen Isolierung des Bact. bulgaricum aus Joghurt angegeben unter Benutzung von glyzerinhaltigen Nährböden, am besten Kochglyzerin-Blutagar.

Das Gewinnen von Oberflächen-Kulturen von Bact. bulgaricum ist sehr leicht.

Die Volutingranula-Bildung steht in engem Zusammenhang mit der Zusammensetzung des Nährbodens und ist mit gutem Wachstum der Kultur eng verbunden.

Die Annahme von zwei verschiedenen „Arten“ von Milchsäurelangbazillen im Joghurt ist auch nach diesen Kulturversuchen unberechtigt.

Literatur.

1. Alexieff, Wl., Clinica bulgara. Bd. 7. S. 241. — 2. Jurukoff, B., Ebenda. Bd. 3. S. 328. — 3. Jurukoff, B., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 120. S. 394. — 4. Kantardjieff, A., Jahresbuch der Universitat Sofia (Agr. Fakultat). 1930/31. S. 397 u. 455. — 5. Lehmann und Neumann, Bakteriologische Diagnostik. 6. Aufl. — 6. Markoff, Wl., Pathogene Mikroorganismen und Immunitat. (Bulg.) 1932. — 7. Nikoloff, P., Jahresbuch der Universitat Sofia (Med. Fakultät). 1934. S. 305.

Nachdruck verboten.

Über die Wirkung von Radium- und ultravioletten Strahlen auf die Entwicklung, die biochemischen Eigenschaften und die Rassenbildung des Aspergillus niger.

[Aus dem Mikrobiologischen Laboratorium des wissenschaftlichen Forschungsinstituts fur Nahrungsmittelkunde — wissenschaftlicher Leiter Prof. N. N. Iwanow — und dem Botanisch-Mikrobiologischen Laboratorium des Instituts fur Rontgenologie und Radiologie — wissenschaftlicher Leiter Akad. G. A. Nadson — Leningrad.]

Von **E. Kresling** und **E. Stern.**

Mit 10 Abbildungen im Text.

Die Frage experimenteller Rassenbildung unter der Einwirkung der Strahlenenergie bei verschiedenen Mikroorganismen ist in der Literatur öfters erörtert worden. Das Entstehen neuer Rassen mit veränderten morphologischen und biochemischen Eigenschaften ist nicht nur von großem theoretischen Interesse, sondern kann auch für die verschiedensten Industriezweige von außerordentlich praktischer Bedeutung sein.

Uns interessierte die Frage der Wirkung des Radiums und der ultravioletten Strahlen auf den zur Gewinnung von Zitronensäure dienenden Pilz Aspergillus niger, speziell auf sein Säurebildungsvermögen.

I. Die Wirkung des Radiums auf die morphologischen Eigenschaften und die Säurebildung des Aspergillus niger.

Die ersten Arbeiten über die Wirkung des Radiums auf Schimmelpilze datieren vom Anfang dieses Jahrhunderts. Dauphin, Koernicke, Dautwitz beobachteten die hemmende Wirkung des Radiums auf die Entwicklung der Pilze: Mortierella, Mucor, Piptocephalis, Thamnidium und Aspergillus, welche sich in einer Verzögerung der Sporenkeimung, der Entwicklung des Myzeliums und der Bildung der Reproduktionsorgane äußerte. Fabre konstatierte bei Aspergillus niger eine entwicklungsstimulierende Wirkung des Radiums bei Anwendung sehr schwacher Dosen desselben. Meyer experimentierte mit einer pathogenen Art: Aspergillus fumigatus. Es ist von großem Interesse, daß nach dem Einwirkenlassen der Radiumstrahlen sowohl der Pilz selbst, wie auch ein Auszug aus der Pilzdecke immunisierende Eigenschaften erlangten, was auf tiefgreifende biologische Veränderungen hindeutet.

Methodik. Als Strahlen-Energiequelle wandten wir in unseren Versuchen Radium-Emanation (Radon) in Glaskapillaren an; als Objekt diente uns zu diesen Versuchen nur ein Aspergillus niger-Stamm (Nr. 3) mit Merkmalen, welche einen guten Säurebildner charakterisieren. Solche sind nach unseren Beobachtungen: eine herabgesetzte Sporenbildung, eine ziemlich dicke, faltige Pilzdecke auf Nährlösungen und glatte, nicht intensiv gefärbte Konidien. Als Nährsubstrat wurde Würze-Agar (Bllg 7,5—8,0; p_H = 5—6) benutzt. Zu den Versuchen wurden in Petrischalen 3 cm voneinander entfernt 2 Riesenkolonien angelegt und das Radonkapillar zwischen dieselben auf den Nährboden gelegt. Die Schalen wurden entweder bei

Zimmertemperatur oder bei 28° C gehalten. In unseren Versuchen variierten wir die Dosen der angewandten Strahlenenergie — von 1—8 millicuries detruits — (im weiteren durch m. c. d. bezeichnet) und das Alter der zum Versuche dienenden Kulturen.

Experimenteller Teil. Das Ausbleiben der Entwicklung der Aspergillus niger-Kultur, d. h. eine vollkommene Sterilisation der Petrischalen, konnten wir mit den angewandten Radondosen (bis 8 m.c.d.) nicht erzielen.

Als beständig auftretende Folgen der Radoneinwirkung auf Aspergillus niger-Kulturen wurde in allen Fällen eine Verzögerung des Wachstums und der Sporenbildung beobachtet. In den Fällen, wenn Kulturen im Stadium keimender Konidien oder eines makroskopisch kaum bemerkbaren Wachstums bestrahlt wurden, bildeten sich vollkommen glatte, flache, sporenlose Kolonien. Nach dem Entfernen des Radonkapillars veränderten sich diese Kolonien großtenteils nicht mehr (besonders bei Anwendung von 6—8 m. c. d. starken Dosen) und ergaben beim Überimpfen

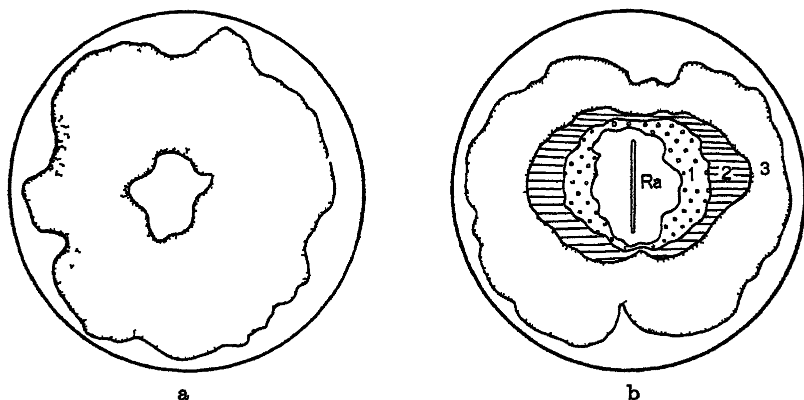


Abb. 1. a Kontrolle normales Wachstum, Sporenbildung. b Versuch. Ra: Radiumkapillar. 1 erste Zone mit flachem, sporenlosem Myzelium. 2: zweite Zone, spärliche Konidienbildung. 3. dritte Zone, normales Wachstum, Sporenbildung.

kein Wachstum. In einigen Versuchen beim Einwirkenlassen schwacherer Dosen trat nach dem Entfernen des Kapillars dennoch Konidienbildung ein.

Bei der Einwirkung des Radons auf Kolonien mit schon vorgeschrittener Entwicklung wurde im Vergleich mit den Kontrollkulturen ein Zurückbleiben in der Entwicklung und hauptsächlich in dem Entstehen und Reifen der Konidien beobachtet. Haufig ist die Pilzdecke der bestrahlten Kulturen etwas festerer Konsistenz als diejenige der Kontrollkulturen; manchmal wird sie gelb.

Sämtliche Abweichungen der radiierten Kulturen von Normalkulturen lassen sich bequem bei kreisformiger Aussaat des Pilzes auf Petrischalen mit dem Radonkapillar in der Mitte beobachten. So zeigt Abb. 1 schematisch das Wachstum einer mit 1,9 m. c. d. radiierten Kultur. In der ersten, zentralen Zone hat sich ein flaches, weißes, sporenloses Myzelium gebildet; die zweite, weiter vom Kapillar entfernte Zone ist weniger stark verändert; sie erscheint etwas bräunlich; es bilden sich hier kurze Konidienträger und wenig Konidien. Die dritte, vom Radonkapillar am weitesten entfernte Zone, weist normale oder fast normale Entwicklung und Konidienbildung auf.

Die Breite der einzelnen Zonen und die Annaherung der außeren Zone zur Norm hangt naturlich von der Starke der angewandten Radondose ab. Diese Zonen haben gewohnlich nicht die Form von konzentrischen Kreisen, sondern erinnern an die Konturen einer vertikal durchschnittenen Apfelsine.

Analoge Wachstumsformen sind von Lacassagne, Nadson und Rochlina und anderen bei einer Reihe von Mikroorganismen unter der Wirkung des Radiums beobachtet worden.

Eine mikroskopische Untersuchung zeigte in der ersten, am stärksten veranderten Zone mit flachem, schwach entwickeltem Myzel bedeutende zytologische Veranderungen (Abb. 2). Die Hyphen bestehen großtenteils aus kurzen, gedrungenen Zellen. Es kommen auch sehr dunne, fadenformige Hyphen vor. Das Plasma erscheint kornig. In der Mitte und den Enden



Abb. 2. a Kontrolle. normale Konidientrager und Hyphen. b Konidientrager und Hyphen aus der ersten Zone (s. Abb. 1 b).

der Hyphen bilden sich ofters blasenformige Anschwellungen. Bei Anwendung stärkerer Radondosen fehlen normale Konidienträger hier gänzlich, bei schwächeren Dosen findet man einzelne stark degenerierte, kurze Konidienträger. Sterigmen fehlen oder sind gleichfalls stark verändert: sie nehmen die Form von langen, fadenartigen Auswüchsen oder kurzen, dicken Gebilden an. Ihre Zahl ist immer beschränkt (2—4). Bei Bearbeitung mikroskopischer Präparate aus dieser Zone mit Sudan III (Glyzerinlosung) fällt im Vergleich zu den Kontrollkulturen der großere Fettgehalt der Hyphen auf. Die rosagefarbten Fettkügelchen erreichen oft beträchtliche Größe. Besonders reich an Fett sind die erweiterten, kurzen Zellen.

Die zweite Zone weist bei der mikroskopischen Untersuchung dieselben Veränderungen auf wie die erste; die Anzahl der normalen Hyphen ist hier jedoch großer. Neben stark veränderten kommen hier auch fast normale Konidienträger vor (Abb. 3). Es werden, wenn auch in geringer Anzahl,

Konidien gebildet, welche sich von denjenigen der Kontrollkultur durch geringere Dimensionen unterscheiden. So beträgt der Durchmesser dieser Konidien durchschnittlich 1,92 μ, während derjenige der Kontrollkulturkonidien 3,0—3,5 μ ausmacht. Unter dem Mikroskop erscheinen diese Konidien hell, glatt und durchsichtig.

In der dritten Zone ist der größte Teil der Konidienträger und Hyphen normal, doch auch hier kommen veränderte Konidienträger und erweiterte Hyphen mit nahestehenden Querwänden vor.

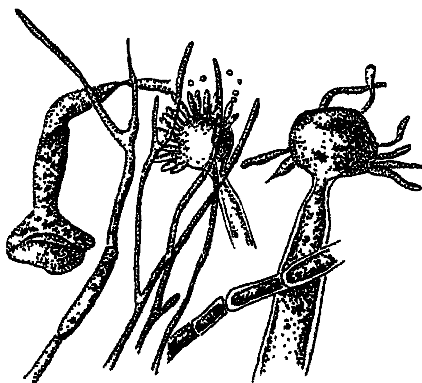


Abb. 3. Konidienträger und Hyphen aus der zweiten Zone (s. Abb. 1 b).

Aus verschiedenen Stellen der bestrahlten Petrischalen wurde auf Würzeschrägagar übergeimpft und die erhaltenen Kulturen auf ihr Säurebildungsvermögen geprüft.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß das Säurebildungsvermögen der Aspergillus niger-Stämme nicht konstant ist; es schwankt besonders stark bei aktiven Säurebildnern, selbst unter anscheinend ganz unveränderten Bedingungen. Diese Schwankungen der Aktivität erschweren alle experimentellen Arbeiten auf dem Gebiet der Zitronensäuregärung beträchtlich. Auch unsere Stämme erwiesen sich in dieser Hinsicht als nicht konstant.

Methodik. Die Pilzdecke wurde auf synthetischem Nährboden (NH_4NO_3: 0,3%, KH_2PO_4: 0,1%, $MgSO_4$: 0,1%, $ZwSO_4$: 0,02%, $FeSO_4$: 0,02%, Saccharose: 20%) kultiviert; nach 2tägigem Wachstum wurde die Nährlösung durch eine 20proz. Saccharoselösung ersetzt, in welcher nach 4tägiger Gärung die Säuremenge durch Titration mit n/10-Lauge bestimmt wurde. Das Wachstum der Pilzdecke und die Gärung fand in Erlenmeyerkolben mit 100 ccm Gärlösung bei 32° C statt.

Die Tabelle 1 zeigt das Säurebildungsvermögen der in verschiedenem Alter radiierten Kulturen unseres Aspergillus niger-Stammes. Die Säurebildung der bestrahlten Kulturen ist in einigen Fällen stärker, in anderen schwächer als die der Kontrollkulturen, doch sind die Abweichungen meistenteils gering. Bei stärkeren Radondosen sind auch die Abweichungen größer. Bei der wiederholten Prüfung nach 3 Monaten und 3—4 Überimpfungen werden diese Abweichungen geringer. Die aus der obenerwähnten dritten, vom Radonkapillar am weitesten entfernten Zone stammenden Kulturen weisen in der Regel intensivere Säurebildung auf.

II. Die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die morphologischen Eigenschaften und die Säurebildung des Aspergillus niger.

Die entwicklungshemmende Wirkung der ultravioletten Strahlen auf Mikroorganismen, darunter auch Pilze, ist von vielen Forschern beobachtet worden.

Einige Autoren behaupten, daß ultraviolette Strahlen bei gewisser Dosierung eine stimulierende Wirkung auf Mikroorganismen ausüben können. So haben G. A. Nadson und G. Philippow in Petrischalen unter der Wirkung ultravioletter Strahlen Zonen forcierten Wachstums, erhöhter

Tab. 1. Die Säurebildung der mit Radon bestrahlten Kulturen.

Bestrahlt wurden Kulturen im Stadium: keimender Konidien oder makroskopisch kaum sichtbarer Kolonien			Bestrahlt wurden Kulturen im Stadium: entwickelten Myzels kurz vor der Konidienbildung		
Radon-dosen in m. c. d.	Säuremenge in g Zitronensäure bei der ersten Prüfung	Säuremenge in g Zitronensäure bei der zweiten Prüfung	Radon-dosen in m. c. d.	Säuremenge in g Zitronensäure bei der ersten Prüfung	Säuremenge in g Zitronensäure bei der zweiten Prüfung
Kontrolle	7,8	5,7	Kontrolle	7,3	—
6,8	7,6	5,7	2,8	5,7[1])	—
6,8	1,8[2])	1,7	2,8	4,9	—
3,9	7,7	—	2,6	4,7	—
Kontrolle	7,4	—	Kontrolle	5,3	—
5,0	7,7	—	1,1	4,9	—
5,0	9,2	—	Kontrolle	5,7	—
Kontrolle	7,7	7,2	2,6	8,1[1])	—
6.2	10,5[1])	7,4	2,6	5,7	—
6,2	4.7	5,7	4,6	4,9	—
Kontrolle	8,3	—	Kontrolle	9,2	8,9
2,4	7,0	—	2,5	9,4	—
1,9	7,0	—	4,8	10[2])	9,2

[1]) Diese Ziffern entsprechen Kulturen, die aus der obenerwähnten dritten Zone isoliert worden waren.

[2]) Diese Ziffern beziehen sich auf eine Kultur, die im IV. Abschnitt als Radiumrasse 3 I beschrieben ist.

Sexualität und geschlechtsloser Vermehrung durch Sporangien bei Schimmelpilzen beobachtet.

Methodik. Zu unseren Versuchen diente uns eine Quecksilber-Quarzlampe von Bach (Hanau, 110—120 V., 3—4 Amp., Spektor: 5790—2200 Å). Die Entfernung der Versuchsobjekte von der Lampe betrug 35 cm. Die als Objekt dienende Aspergillus niger-Kultur war dieselbe wie in den obenerwähnten Versuchen mit Radon. Zu den Versuchen wurden je zwei Riesenkolonien oder 40—50 verstreut liegende Kolonien in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) mit Würzeagar benutzt. Nach der Bestrahlung wurden die Schalen für einige Tage bei 22—24° C aufbewahrt.

Experimenteller Teil. Die ultravioletten Strahlen hemmen ebenso wie das Radium die Entwicklung und die Konidienbildung, was sich beim Bestrahlen von jungen, 12stünd. Kulturen sogar nach einer eine Minute dauernden Exposition bemerkbar machte. Nach kurzen Expositionen (1—3 Min.) erlangen die Versuchskulturen nur allmählich normales Aussehen, so daß man sie nach einigen Tagen nicht mehr von den Kontrollkulturen unterscheiden kann. Bei den 15—30 Min. lang bestrahlten Kulturen bleibt der Unterschied bestehen: die Konidienbildung ist geringer. Als letale Dose für sehr junge Kulturen im Stadium keimender Konidien erwies sich in unseren Versuchen eine 20 Min. dauernde Bestrahlung.

Die durch ultraviolette Strahlen hervorgerufenen morphologischen Veränderungen waren im Prinzip dieselben wie bei der Einwirkung von Radon.

Von den bestrahlten Schalen wurden gleichfalls Kulturen auf Schrägröhrchen angelegt und ihr Säurebildungsvermögen geprüft.

Beim Bestrahlen junger Kulturen im Stadium keimender Konidien oder makroskopisch kaum sichtbarer Kolonien wird öfters eine gewisse Gesetz-

mäßigkeit beobachtet: je länger eine Kultur der Wirkung der ultravioletten Strahlen ausgesetzt wird, desto geringer ist die produzierte Säuremenge (Tab. 2).

Tab. 2. Die Saurebildung der ultravioletten Strahlen ausgesetzten Kulturen.

Bestrahlt wurden Kulturen im Stadium keimender Konidien oder makroskopisch kaum sichtbarer Kolonien			Bestrahlt wurden Kulturen im Stadium entwickelten Myzels kurz vor der Konidienbildung	
Expositionsdauer in Min.	Säuremenge in g Zitronensäure bei der ersten Prüfung	Säuremenge in g Zitronensäure bei der zweiten Prüfung	Expositionsdauer in Min.	Säuremengen in g Zitronensäure
Kontrolle	9,8	7,1	Kontrolle	6,7
5	9,6	7,4	2	8,8
15	9,4	7,6	5	3,5
20	5,3	5,8	—	—
30	4,1	5,7	10	4,0
Kontrolle	6,9	6,2	Kontrolle	6,9
1	6,5	6,0	5	6,2
2	9,6	11,0	5	9,3[1])
3	6,8	6,2	10	6,7
5	6,9	5,5	10	9,2[1])

[1]) Diese Ziffern beziehen sich auf Kulturen, die aus der äußeren Zone der bestrahlten Kolonien übergeimpft worden waren.

In einem Falle produzierte die Versuchskultur nach 2 Min. langer Exposition mehr Säure als die Kontrollkultur (9,6 gegen 6,9 g). Nach 3—4 Überimpfungen wurden die Kulturen aufs neue geprüft, wobei die erwähnte bestrahlte Kultur noch mehr Säure bildete (11 g), während die Säuremenge der Kontrollkultur fast unverändert blieb (6,2). In den anderen Fällen erwiesen sich die Abweichungen im Säurebildungsvermögen geringer als bei der ersten Prüfung.

Beim Bestrahlen schon entwickelter Kulturen unmittelbar vor der Konidienbildung sank das Säurebildungsvermögen in einem Falle bei 5—10 Min. langer Exposition und stieg bei 2 Min. langem Einwirkenlassen; im anderen Falle übte auch eine 5 Min. dauernde Exposition eine gewisse stimulierende Wirkung aus. Auch hier wurden die größten Säuremengen (9,3 und 9,2 g gegen 6,9 g in der Kontrolle) von Kulturen gebildet, welche aus den Stellen der bestrahlten Petrischalen stammten, wo die ultravioletten Strahlen keine entwicklungshemmende Wirkung ausgeübt hatten, d. h. aus den äußeren üppig sporenbildenden, erst nach der Bestrahlung entstandenen Zonen der Kolonien.

III. Die Wirkung des Radons auf den Prozeß der Zitronensäuregärung.

Die Literaturangaben über den Einfluß des Radiums auf verschiedene Gärungsprozesse sind recht spärlich und widersprechend.

Einige Autoren (Richet, Fürstenberg, Höstern u. a.) beobachteten eine hemmende Wirkung des Radiums auf den Hefe- und Milchsäure-Gärungsprozeß.

Plesch und Karczag konnten gar keine Veränderungen im Verlauf der Alkoholgärung unter dem Einfluß von Torium x konstatieren.

In vorliegendem Abschnitt unserer Arbeit wollten wir feststellen, ob eine Zugabe von Radium-Emanation unmittelbar zur Gärlösung den Säurebildungsprozeß beeinflußt und ob die Wirkung des Radons auf eine Reihe von Kulturen mit verschiedenem Säurebildungsvermögen verschieden ist.

Methodik. Die Versuche wurden in kleinen Erlenmeyerkolben mit 25 ccm Nähr- und Gärflüssigkeit im Thermostaten bei 32° C durchgeführt. Im übrigen ist die Versuchsanordnung dieselbe, wie oben angeführt. Die Radium-Emanation wurde auf folgende Weise zugesetzt: die Radonröhrchen wurden rasch abflambiert, in ein sterile s, 10 ccm Wasser enthaltendes kleines Gefäß mit angepaßtem Glasstopfen gebracht, das Gefäß geschlossen, die Röhrchen unter Wasser zerdrückt, das Wasser durchgeschüttelt und mit steriler Pipette in die Versuchskolben gebracht.

Als Objekte dienten uns 6 Aspergillus niger-Stämme, von welchen einige seit längerer Zeit in mikrobiologischen Laboratorien kultiviert, die anderen von uns von Früchten isoliert worden waren. Alle waren Einzellkulturen.

Die gesamte Säuremenge wurde durch Titration der Gärflüssigkeit festgestellt und in Gramm Zitronensäure auf 100 ccm Gärlösung ausgedrückt. In einigen Fällen wurde der Gehalt an Zitronen-, Oxal- und Glukonsäure analytisch bestimmt.

Auch hier variieren wir sowohl die Dosen der Radium-Emanation wie auch das Alter der Versuchskulturen.

Experimenteller Teil. Beim Zufügen von Radon zur Nährlösung unmittelbar nach der Aussaat der Konidien wurde keine Steigerung der Säureproduktion erzielt. Tabelle 3 zeigt als Beispiel die für 2 Kulturen erhaltenen Ziffern.

Tab. 3. Die Säurebildung beim Zufügen von Radon zur Nährlösung gleichzeitig mit der Impfung.

Radondosen in m. c. d.	Säuremengen in g Zitronensäure in 100 ccm	
	Stamm 1	Stamm 6
Kontrolle	1,53	9,63
0,48—0,72	1,72	9,48
1,80—2,40	1,52	9,19
3,00—4,00	1,52	8,45

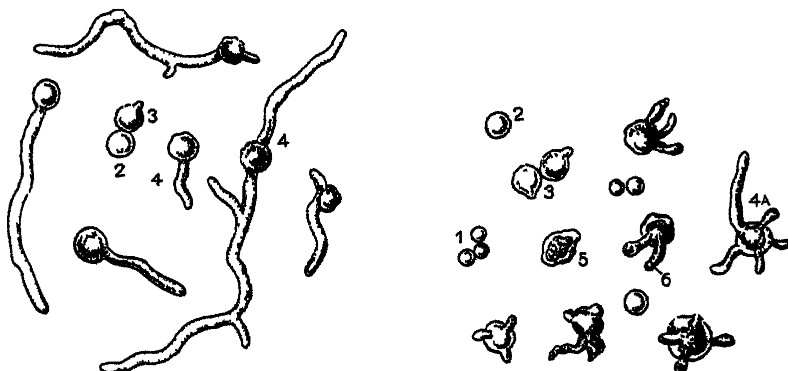


Abb. 4. a Normale Konidienkeimung. b Konidienkeimung unter der Wirkung von Radium-Emanation (starke Dosen). 1 unveränderte Konidien. 2 geschwollene Konidien. 3 anfängl. Stadium der Konidienkeimung. 4 normale Keimung. 4 a anormale Keimung. 5 deformierte Konidien. 6 Fetttropfen.

Das Entstehen einer einheitlichen Pilzdecke wird jedoch bedeutend gehemmt. Außerdem wirkt das Rodan bei Anwendung stärkerer Dosen auch auf die Konidienkeimung: es entstehen aus einer einzigen Konidie zu gleicher Zeit bis zu 7—8 Keimschläuche, während unter normalen Bedingungen höchstens 2 gebildet werden (Abb. 4). Weitere Entwicklung tritt dabei jedoch nicht ein; die Konidien und die Auswüchse sind mit einer großen Menge von Fetttröpfchen angefüllt und sterben ab. Diese Erscheinung ist bereits bei Pilzen unter der Wirkung von Radium von Kornicke und Dautwitz und bei Hefen von G. A. Nadson und Rochlina beobachtet worden.

Wird jedoch das Radon zur Gärflüssigkeit nach 2tägigem Wachstum des Pilzes auf der Nährlösung, wenn sich bereits eine feste Pilzdecke gebildet hat, zugefügt, so läßt sich meistenteils eine größere Säureausbeute erzielen (Tab. 4). Die bedeutendste Steigerung der Säurebildung weist ein schwacher Säurebildner, der Stamm 1 auf (2—3mal mehr Säure als in der Kontrolle).

Tab. 4. Die Säurebildung beim Zufügen von Radon zur Gärlösung nach 2tägigem Wachstum der Pilzdecke.

Radondosen in m. c. d.	Säuremengen in g Zitronensäure in 100 ccm Gärlösung										
	Stamm 1	Stamm 2	Stamm 3				Stamm 4	Stamm 5	Stamm 6		
			a	b	c	d					
Kontrolle	1,52	2,19	4,26	5,23	7,29	9,25	6,91	6,83	7,71	10,00	12,79
1,0— 1,2	1,56	—	6,24	7,20	—	8,79	—	—	8,60	9,23	—
1,8— 2,4	1,75	—	—	7,52	7,40	8,29	—	7,78	8,70	9,11	12,73
3,0— 4,0	2,43	2,50	—	7,00	—	8,45	7,07	—	8,52	9,70	—
4,8	3,12	—	—	—	—	7,29	—	8,50	8,80	8,44	12,75
8,0— 9,6	5,00	2,70	—	7,52	8,66	—	7,33	9,13	9,58	—	12,53
10,8—12,0	—	2,66	—	—	8,28	—	6,82	8,92	—	—	11,87

Der andere schwache Säurebildner, Stamm 2, und der Stamm 4 reagierten dagegen nicht auf das zugesetzte Radon. Der Stamm 5 bildet unter der Einwirkung des Radons gleichfalls größere Säuremengen als die Kontrollkulturen. Besondere Beachtung sei den Kulturen 3 (a, b, c und d) gewidmet. Alle sind von ein- und demselben Stamm abgeleitet worden: b ist eine Einzellkultur aus a; c und d sind Einzellkulturen aus b. Die Ausgangskultur a ist vorher gleichfalls aus einer Zelle isoliert worden. Ihrem Aussehen und ihren morphologischen Eigenschaften nach läßt sich kein Unterschied zwischen diesen Kulturen feststellen. Die schwächeren Säurebildner, die Kulturen a, b und c bilden unter der Wirkung des Radons größere Säuremengen als die Kontrollen, während der stärkste Säurebildner, die Kultur d, unter der Einwirkung der Radium-Emanation sogar etwas weniger Säure anhäufte als in den Kontrollkolben. Es ist möglich, daß die Kulturen c und d durch stärkere Radondosen als die von uns angewandten aktiviert werden könnten, jedoch wahrscheinlicher ist die Annahme, daß für jeden Stamm ein bestimmtes Maximum der Säureproduktion existiert, welches durch Anwendung eines stimulierenden Mittels nicht überschritten werden kann. In gegebenem Fall ist dieses Maximum für den Stamm 3 durch die Kultur d erreicht worden. Dieselbe Erscheinung wird auch beim Stamm 6 beobachtet. Dieser Stamm bildet in den Kontrollen der einzelnen Versuchsreihen verschiedene Säuremengen. Eine gewisse Aktivierung konnte nur in den Ver-

suchsreihen erzielt werden, in welchen die Kontrollen im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen geringere Säuremengen anhäuften. In den Versuchen, in welchen die Kontrollen die höchsten Säuremengen bildeten, reagierte der Stamm nicht auf das zugesetzte Radon. In diesem Falle hatte der Stamm sein Säuremaximum erreicht.

Um das günstigste Alter der Kulturen für die Aktivierung des Säurebildungsprozesses durch Radon zu ermitteln, wurde Radium-Emanation in Versuchen mit 2 Kulturen — 1 und 6 — in verschiedenem Alter zugefügt: gleichzeitig mit der Impfung und nach 48-, 72- und 120stünd. Wachstum (Tab. 5).

Tab. 5. Die Säurebildung beim Zufügen von Radon zur Lösung in verschiedenem Alter der Pilzdecke.

Termine der Zugabe von Radon zur Lösung	Säuremengen in g Zitronensäure auf 100 ccm	
	Stamm 1	Stamm 6
Kontrolle	1,63	8,42
gleichzeitig mit der Impfung	2,08	7,20
nach 48 Std.	3,22	9,62
nach 72 Std.	3,80	8,94
nach 120 Std.	1,82	8,32

Der Stamm 1 bildete in allen Versuchskolben mehr Säure als in den Kontrollkolben. Die maximale Aktivierung wurde beim Zufügen von Radon nach 48stünd. Wachstum beobachtet; eine schwächere: nach 72-, ganz geringe nach 120stünd. Wachstum und beim Zufügen von Radon zur Nährlösung gleichzeitig mit der Impfung. Im letzten Falle wurde beim Stamm 6 sogar eine geringere Säureausbeute als in der Kontrolle beobachtet. Eine gewisse Aktivierung tritt bei diesem Stamm bei der Einwirkung von Radon auf die 48stünd. Pilzdecke ein. Das günstigste Alter der Pilzdecke für die Aktivierung des Säurebildungsprozesses durch Radon scheint somit ein 2tägiges zu sein.

Was den Verlauf des Säurebildungsprozesses unter der Wirkung von Radon anbelangt, so läßt er sich am besten beim Stamm 1 beobachten. Das Diagramm (Abb. 5) zeigt 5 Kurven der Säureanhäufung (zu je 2 Parallelversuchen; bei Zufügen von 2,7 m. c. stimmten die beiden Kurven vollkommen überein) beim Zufügen von Radon, zur Gärlösung. Der Prozeß verläuft nicht nur energischer, was die Säureausbeute, sondern auch was die Dauer des Prozesses anbelangt. Die größte Ausbeute wird bei Anwendung der stärkeren Radondosis erhalten.

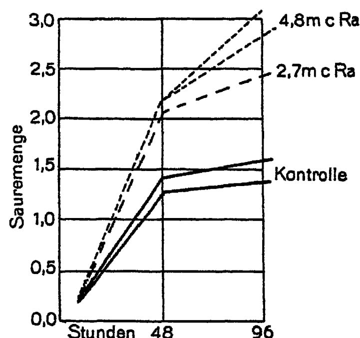


Abb. 5. Der Säurebildungsprozeß unter der Einwirkung von Radon beim Stamm 1.

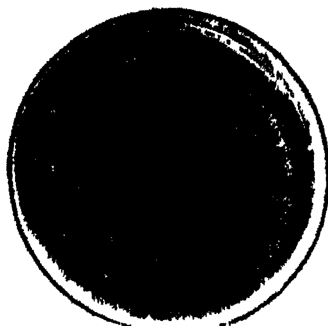
Im weiteren mußte festgestellt werden, ob die Steigerung der Gesamtsäuremenge auf Kosten der Zitronensäure vor sich geht, oder ob wir es hier mit einem energischer verlaufenden Oxydationsprozeß unter Bildung von gesteigerten Mengen eines Pro-

duktes der weiteren Oxydierung, der Oxalsäure, zu tun haben. Zu diesem Zwecke wurden die Gärlosungen auf ihren Gehalt an Zitronen-, Oxal- und Glukonsäure untersucht. Die Resultate dieser Analysen sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tab. 6. Die Saureanalyse der Gärlosungen bei der Einwirkung von Radon.

Versuchsbedingungen		Sauremenge in g auf 100 ccm Gärlosung		
		Zitronensaure	Glukonsaure	Oxalsaure
Stamm 1	Kontrolle	1,28	0,30	0,33
	+ Radon	4,64	0,30	0,32
Stamm 3b	Kontrolle	4,76	0,40	0,12
	+ Radon	6,88	0,30	0,21
Stamm 5	Kontrolle	6,40	0,42	0,08
	+ Radon	8,66	0,68	0,05
Stamm 6	Kontrolle	7,20	0,80	0,22
	+ Radon	8,80	0,80	0,13

Es ist somit festgestellt worden, daß die durch Einwirkenlassen von Radon erzielte Steigerung der Gesamtsäuremenge durch die Produktion großerer Zitronensäuremengen hervorgerufen wird. Die Menge der beiden anderen Säuren verändert sich dabei wenig.





a b

Abb. 6. Ausgangsrasse: Asp. niger-Stamm 3. a Kolonie auf Wurzeagar; b mikroskopisches Bild

IV. Die Radiumrassen des Aspergillus niger.

Während unserer Arbeit hatte sich unter der Einwirkung des Radons eine Reihe neuer Aspergillus-Rassen mit veränderten biochemischen und morphologischen Eigenschaften gebildet. Diese Radiumrassen erwiesen sich als konstant; sie sind im Laufe von 1½—2 Jahren alle 2 Monate übergeimpft worden, ohne zu den Ausgangsformen zurückzukehren. So entstand beim Einwirkenlassen von 6,8 m. c. d. Radium-Emanation auf eine Riesenkolonie des Stammes 3 auf Würzeagar eine neue Rasse 3_1, welche sich stark von der Ausgangsrasse unterscheidet. Die Ausgangsrasse 3 zeichnet sich durch üppige Lufthyphenbildung aus; Fruchtträger entstehen nur im obersten Teil der schrägen Agaroberfläche in Reagenzröhrchen; sie weisen jedoch einen normalen, für Aspergillus niger typischen Bau auf (Abb. 6).

Der Radiumstamm 3_1 bildet ein kompaktes, weißes, flaches, konidienloses Myzel (Abb. 7). Die Kulturen auf Würzeagar und auf synthetischer Nährlösung entwickeln sich langsam. Bei der mikroskopischen Untersuchung dieser Kultur zeigte es sich, daß wir es hier mit einer Degenerationsform zu tun haben; die Konidienträger sind kurz. und am Ende nicht kugelförmig, wie es für *Aspergillus niger* charakteristisch ist, sondern länglich, birnenförmig erweitert. Sterigmen fehlen vollkommen oder sind kurz und

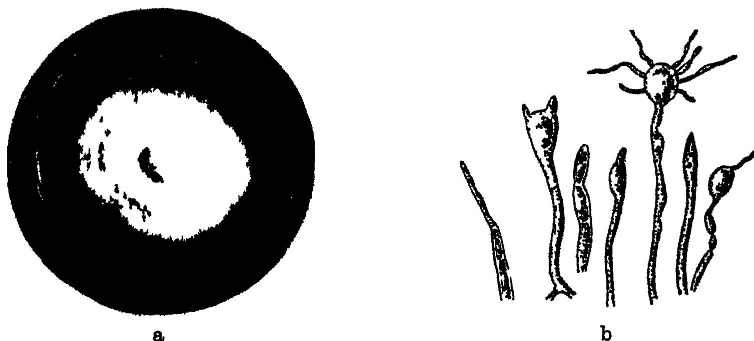


Abb. 7. Radiumrasse 3: weißes, sporenloses Myzelium. a Kolonien auf Würzeagar. b mikroskopisches Bild.

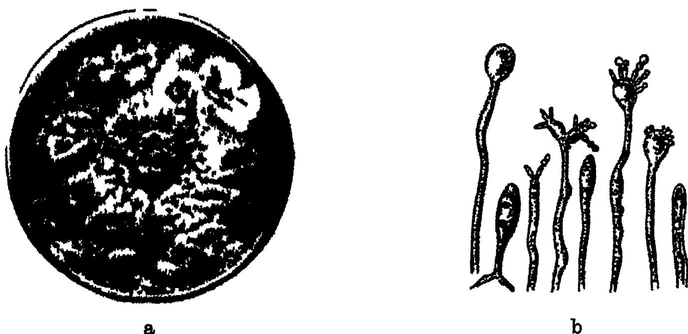


Abb. 8. Säurerasse 3_{II}: die Kultur erscheint bräunlich-grau. a Kolonie auf Würzeagar. b mikroskopisches Bild.

dick oder fadenförmig und entstehen in geringer Anzahl (1—2—3). Konidien werden nicht gebildet. Ein Teil der Hyphen ist erweitert und mit häufigen Querwänden versehen. Die Zellen, besonders die erweiterten, enthalten viele Fetttropfen.

Diese Radiumrasse ist H. *Kordo-Ssyssojewa*, welche die Wirkung von Säuren auf *Aspergillus niger* studierte, übergeben worden und von ihr dreimal auf saurem Nährboden kultiviert worden (N/40 HCl), wobei die Kulturen abwechselnd auf saurem Nährboden und auf gewöhnlichem Würzeagar gezüchtet wurden. Es entstand dabei eine neue Rasse 3_{II}, welche sich sowohl von der Ausgangsrasse 3 wie auch von der Radiumrasse 3_1 unterschied. Die Farbe der erhaltenen Kultur ist bräunlich-grau; das Myzel ist kompakt, faltig, die Konidienträger kurz und dichtgestellt, die Köpfchen

so klein, daß man sie mit bloßem Auge nicht unterscheiden kann. Die Anschwellungen an den Enden der Konidienträger sind ihrer Form nach denjenigen des Radiumstammes 3_I gleich, die Sterigmen nähern sich jedoch der Norm und schnüren auch Konidien ab (Abb. 8). Die Radiumrassen 3_I und 3_{II} sind im Laufe von zwei Jahren unverändert geblieben.

Außer diesen Rassen sind auch erblich konstante Rassen durch die Einwirkung von Radon während der Gärung erhalten worden. Beim Zufügen von Radon zur Nährlösung gleichzeitig mit der Impfung wird öfters das Entstehen uneinheitlicher, fleckiger Pilzdecken beobachtet. Beim Überimpfen aus solchen Pilzdecken ist es uns gelungen, konstante Mutanten zu erhalten. Bei der Einwirkung von 1,8 und 8 m. c. d. (in 100 ccm Nährlösung) auf den Stamm 1, der sich durch üppige Konidienbildung und eine verhältnismäßig dünne, glatte Pilzdecke auf Nährboden auszeichnet, konnten wir dreimal einen Stamm mit sandfarbenen Konidien isolieren. Seinen anderen morphologischen Eigenschaften nach unterscheidet sich dieser Stamm 1_I

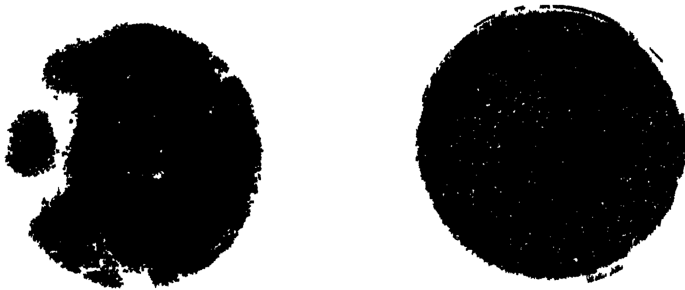


Abb. 9. a Kolonie der Ausgangsrasse Asp. niger-Stamm 1: schwarz. b Kolonie der Radiumrasse 1_I: sandfarben.

nicht von seiner Ausgangsform (Abb. 9). In jungen Kulturen sind die Konidien dieses Stammes weiß, es ist uns jedoch nicht gelungen, einen konstanten Stamm mit farblosen Konidien, selbst durch wiederholte Bestrahlung, zu erhalten.

Ferner entstanden aus dem aktivsten, uns infolgedessen am meisten interessierenden Stamme 6 drei neue Formen.

Die Ausgangsrasse, der Stamm 6 ist morphologisch dem Stamm 3 gleich, er bildet jedoch bedeutend mehr Säure (bis zu 13 g). Es entstanden folgende Radiumrassen:

Die Radiumrasse 6_I bildet auf Würzeagar eine faltige, weiße, flache Pilzdecke mit sehr kleinen Fruchtträgern. Beim Mikroskopieren sieht man in den Hyphen viele Fetttropfen, öfters blasenartige Anschwellungen und körnigen Zellinhalt. Dieser Stamm erinnert gewissermaßen an den Radiumstamm 3_I, die Reproduktionsorgane des letzteren sind jedoch stark deformiert, makroskopisch nicht wahrnehmbar und ohne Konidien, während diejenigen des Stammes 6_I, wenn auch klein, so doch makroskopisch zu unterscheiden und weniger verändert sind. Von den Reproduktionsorganen des Ausgangsstammes unterscheiden sie sich noch dadurch, daß der größte Teil derselben nur eine Reihe Sterigmen aufweist, während die Ausgangsrasse primäre und sekundäre Sterigmen bildet (Abb. 10).

Die Radiumrasse 6_{II} unterscheidet sich morphologisch nur durch üppigere Konidienbildung von der Ausgangskultur.

Die Radiumrasse 6_{III} ist morphologisch der Ausgangsrasse vollkommen gleich, jedoch infolge von veränderten biochemischen Eigenschaften von Interesse.

Die Resultate der Prüfung des Säurebildungsvermögens und der Analysen der Gärflüssigkeiten der Radiumrassen sind in Tabelle 7 angeführt.

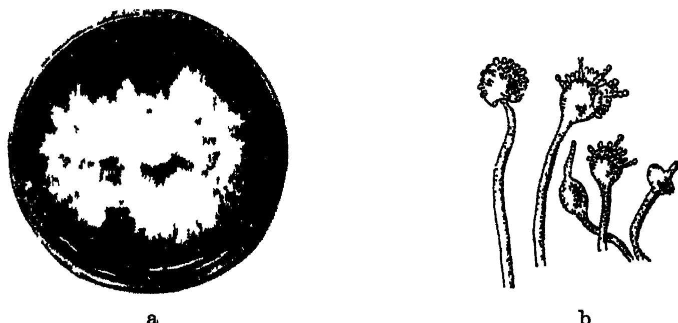


Abb. 10. a Kolonie der Radiumrasse 6_I. b Konidienträger der Radiumrasse 6_I, einfache Sterigmen. Die Ausgangsrassse 6 gleicht der Rasse 3 (siehe Abb 6)

Tab. 7. Die biochemischen Eigenschaften der Radiumrassen.

Stämme	Säuremengen in g in 100 ccm Gärlösung			Zucker in g in 100 ccm Gärlösg.		Trockengewicht der Pilzdecke in g
	Zitronensäure	Glukonsäure	Oxalsäure	verbraucht	Rest	
Ausgangsstamm 3	5,21	0,90	0,19	13,35	6,65	4,579
Radiumrasse 3_I .	0,18	2,91	0,00	11,66	8,34	3,822
Säurerasse 3_{II} . .	0,00	2,60	0,00	12,50	7,50	4,132
Ausgangsstamm 1	1,64	0,34	0,33	18,7	1,3	4,934
Radiumrasse 1_I .	0,00	0,58	0,00	15,0	5,0	4,872
Ausgangsstamm 6	11,88	1,16	0,33	18,7	1,3	3,554
Radiumrasse 6_I .	0,68	0,84	0,33	15,0	5,0	3,869
Radiumrasse 6_{II} .	0,00	2,33	0,20	14,0	6,0	4,761
Radiumrasse 6_{III} .	7,52	0,73	1,00	15,4	4,6	3,624

Es zeigte sich, daß die biochemischen Eigenschaften der Radiumrassen bedeutende Abweichungen von denjenigen der Ausgangsformen aufwiesen.

So bildet der Radiumstamm 3_1 bedeutend weniger Zitronensäure als der Ausgangsstamm 3 (0,18 gegen 5,21), viel größere Mengen von Glukonsäure (2,91 gegen 0,90) und gar keine Oxalsäure.

Der den sauren Nährboden passierte Stamm 3_{II} steht seinen biochemischen Eigenschaften nach dem Stamm 3_1 nahe.

Der Radiumstamm 1_I (sandfarben) hat die Fähigkeit, Zitronen- und Oxalsäure zu bilden, gänzlich eingebüßt und läßt nur Glukonsäure entstehen, während die Ausgangsform alle drei Säuren bildete.

Die Ausgangsrasse 6 bildet bedeutende Mengen von Zitronensäure (in gegebenem Falle 11,88 g).

Die Radiumrasse 6_{I} bildet nur wenig Zitronensaure (0,68 g).

Die Radiumrasse 6_{II} ist uberhaupt nicht imstande, Zitronensaure zu produzieren, bildet dagegen doppelt so viel Glukonsaure als die Ausgangsrasse.

Die Radiumrasse 6_{III}, die sich ihren morphologischen Eigenschaften nach nicht von der Ausgangsrasse unterscheidet, bildet jedoch bedeutend geringere Mengen von Zitronensäure (7,52 g gegen 11,88 g) und mehr Oxalsaure (1,0 g gegen 0,33 g) als die Ausgangsrasse.

Es ist somit festgestellt worden, daß durch Radium-Emanation tiefgreifende Veränderungen der biochemischen Eigenschaften hervorgerufen werden konnen, welche jedoch nicht immer durch wesentliche Veranderungen der morphologischen Merkmale begleitet werden (Stamm 6_{II} und 6_{III}).

Schlußfolgerungen.

1. Radium-Emanation und ultraviolette Strahlen hemmen die Entwicklung von Aspergillus niger-Kulturen und verursachen eine Reihe von morphologischen Veränderungen (besonders bei jungen Kulturen).

2. Radon und ultraviolette Strahlen beeinflussen die biochemischen Eigenschaften der Aspergillus niger-Kulturen, indem sie das Säurebildungsvermogen verändern.

3. Eine Zugabe von Radium-Emanation zur Nährlösung am Anfang des Prozesses der Zitronensäuregärung hatte keine Steigerung der Säureausbeute zur Folge.

4. Durch Zufugen von Radon zur Gärlösung nach 2tägigem Wachstum der Pilzdecke konnte eine Aktivierung des Prozesses erzielt werden, wobei verschiedene Aspergillus niger-Stämme sich verschieden verhielten. Die großte Steigerung der Säureausbeute wurde bei einem schwachen Säurebildner beobachtet (2—3mal mehr Säure als in der Kontrolle).

5. Unter der Einwirkung von Radium-Emanation entstanden neue, erblich konstante Rassen, die sich von der Ausgangsform durch morphologische und biochemische Eigenschaften unterscheiden.

Literatur.

1. Dauphin, Compt. rend. de l'Acad. de Science. T. 138 1904. — 2. Koernicke, Berichte d. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 22. 1904. — 3. Dautwitz, Ztschr. f. Heilk. Bd. 2. 1906. — 4. Fabre, Compt. rend. de la Soc. de biol. 1911. p. 187. — 5. Meuer, Monogr. „Contribution a l'etude de l'asperg fumigatus etc" Strasbourg 1927. — 6. Nadson und Philippow, Rontgenol u. Radiol. Bd. 5. 1927. S. 6. — 7. Richet, Biochem Ztschr. Bd. 13. 1908. S. 136. — 8. Furstenberg und Hostern n. Lazarus, Handbuch d. Radiumbiologie u. Therapie. 1928. — 9. Plesch und Karczag n. Lazarus, Handbuch d. Radiumbiologie u Therapie. 1928. — 10. Nadson und Rochlina, Rontgenologie u. Radiologie. 1933.

Nachdruck verboten.

Variation in a species of Fusarium induced by high concentrations of Zinc salts.

[From the Department of Plant Pathology, College of Agriculture, University of California, Berkeley, California, USA.]

By **A. W. Dimock.**

With 3 figures in the text.

The factors responsible for the appearance of variations in presumably pure strains of fungi have been the subject of study for many years. Brown (4), Dickinson (6), Tu (18) and Mitra (15) have noted that sectoring in certain Fusarium and Helminthosporium species is favored by cultivation of the fungi on media of high sugar content. Schiemann (16), Barnes (2), and Heldmaier (13) have found variation to be induced by the exposure of mycelium and spores of various fungi to high temperatures. Christensen (5) observed that sectoring in colonies of Helminthosporium sativum is greatly increased by cultivation at high temperatures. The production of variants by the exposure of mycelium and spores to ultra-violet radiation has been reported by Dickson (7) and by Greaney and Machacek (11). Variation induced by the action of X-rays has been noted by Dickson (7, 8), Zickler (21) and Wulker (20), and definite genetical studies on X-ray-induced variants have been carried out by Heldmaier (13), Dodge (9) and Tai (17).

The first report of variation resulting from the addition of a chemical substance to the substrate was that of Arcichovskij (1). In a physiological study of a normal, black-spored strain of Aspergillus niger he found that optimum growth on Raulin's solution was attained when zinc sulfate was added at a concentration of 0.0001 N. Growth was almost inhibited when the zinc sulfate concentration was raised to 0.03 N. A series of cultures, proceeding from spores obtained from a colony developing on medium containing 0.025 N zinc sulfate, was established in flasks of Raulin's solution containing 0.0001 N zinc sulfate. In the fifth culture generation of this series, a variant type appeared which bore yellowish-brown, rather than black, spores, and which produced a strong reddish-brown coloration of the normally colorless culture fluid. This new strain retained its differences from the normal through 24 transfer generations. The normal strain remained perfectly true to type through a parallel series of cultures.

Schiemann (16), Watermann (19), Haenicke (12), Heldmaier (13) and Galloway (10) have all reported the appearance of variants in cultures of fungi when grown on media containing various toxic substances, including narcotics, organic acids, and heavy metal salts. Zinc salts were not employed by any of these workers. Brierley (3) was unable to induce any permanent alteration in either Aspergillus or Penicillium species by the addition to the medium of the toxic substances, including zinc sulfate, used by previous investigators. Tu (18) was likewise unsuccessful in producing variation in certain Fusarium species by the addition of zinc sulfate or other toxic substances to the substrate.

It should be noted that both Brierley and Tu used concentrations of zinc sulfate which were far below the toxic limit, apparently overlooking the fact that Arcichovskij had grown his strain of A. niger on medium containing 0.025 N zinc sulfate (which was near the toxic limit) prior to transferring it to the medium containing 0.0001 N zinc sulfate (the optimum concentration) on which the variant became apparent.

Production of Variants.

A Fusarium strain[1]) was reisolated from a diseased gladiolus plant which had previously been inoculated with a single-spore culture of the strain. Single-spore cultures of the reisolate were made, and as all were alike, one was taken at random for use as the parent strain in the investigations reported here. Numerous single-spore cultures of the strain were grown on ordinary laboratory media (such as potato-dextrose-agar, malt-extract-agar, oatmeal-agar, etc.) over a period of one year, and never was any variation or sectoring observed. During the course of studies on the effects of high concentrations of the heavy metal salts on the growth of the fungus, however, sectors were repeatedly observed developing in colonies on media containing

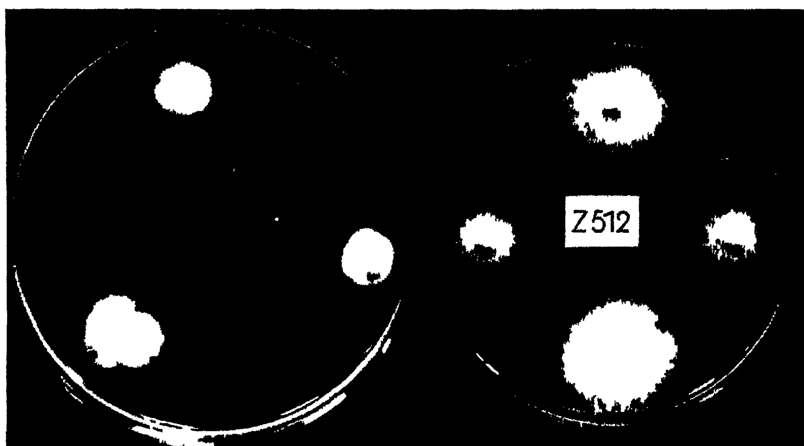


Fig. 1. Left: "Sector" in 9 day colony on medium containing zinc sulfate. Right: 3 day colonies on ordinary Coons' synthetic medium of transfers of "parent" and "sector" growth from the plate shown at the left. Top and bottom colonies are from the "parent" growth; left and right colonies are from the "sector". Note that on Coons' medium with zinc sulfate the "sector" growth is more rapid, whereas on the same medium without zinc sulfate the reverse is true.

zinc salts (Fig. 1). In one case, an inoculum disc (see next paragraph) from which growth had failed to develop after 15 days on medium containing zinc chloride at a concentration of 7.5 g of zinc per liter was transferred to a petri plate of potato-dextrose-agar. On this medium very slow growth developed from one point, while growth from the rest of the disc was quite normal. Sub-cultures derived from the normal and the slow-growing portions of this colony were studied carefully and will be referred to subsequently

[1]) Tentatively identified as Fusarium oxysporum var. gladioli (Schlecht.) Massey.

as strains II and IIs respectively. The repeated occurrence of sectoring on media containing zinc salts prompted the writer to make a more thorough investigation of the phenomenon.

Two series of petri plates were poured with Coons' synthetic agar medium to which zinc salts were added. One series contained zinc sulfate at a concentration of 4.5 g per liter, and the other contained zinc nitrate at the same concentration. Ten plates of each series were then inoculated with single germinating microconidia of the Fusarium strain, three single conidia being planted on each plate at points equidistant from one another and about 2 cm. from the edge of the plate. The isolated germinating conidia were located with the aid of a microscope on plates of Czapek's agar medium, and the spores and supporting agar transferred to the zinc-containing media with a sterile needle. Ten plates of each zinc-salt series were also planted with inoculum discs which were cut with a 5 mm. cork borer from petri plates poured with Czapek's agar containing a heavy suspension of microconidia of the parent Fusarium strain. Parallel series of plates of Coons' medium to which no zinc salt had been added were similarly inoculated to serve as controls. Daily observations were made, and when sectors became apparent, small bits of marginal growth from both the sector and the main colony were transferred to potato-dextrose-agar slopes. The slopes were made up especially for this study in order to insure uniformity of the medium.

The first sectors started to develop in about four days in the colonies on medium containing zinc nitrate. Two sectors appeared in colonies starting from inoculum discs and two in colonies starting from single spores. All were on different plates. A strain originating from one of the sectors developing in a disc colony (designated as Is) remained constant through numerous mass-transfers on potato-dextrose-agar and appeared to be identical with IIs (see above), but transfers from the other sector reverted to normal on potato-dextrose-agar slopes. Strains originating from the two sectors developing in single-spore colonies (designated as IIIs and IVs) seemed to be identical with one another, and remained constant through numerous mass-transfers on potato-dextrose-agar slopes.

The first sectors on medium containing zinc sulfate developed in single-spore colonies in about nine days. Seven sectors appeared, but only two of them showed differences from the normal on the potato-dextrose-agar slopes to which mass transfers were made. One of those (Vs) failed to form conidia, but remained constant through numerous mass-transfers on potato-dextrose-agar slopes. The "sector" from which it was obtained was a submerged outgrowth quite a bit in advance of the main colony and distinct from it. The other, also obtained from a submerged outgrowth, similarly failed to delimit conidia during the first few days of growth on potato-dextrose-agar slopes, but eventually reverted to the normal, sporulating form. Many mass-transfers from this second "sector" gave the same reversion to normal after a few days of growth, but no reversion occurred in any of several transfers from the first "sector".

Mass-transfers from the main growth of colonies (i. e., not from sectors) on all the plates have given rise to growth apparently identical with the parent or normal strain on potato-dextrose-agar medium. No sectoring or variation of any sort appeared on any of the check plates. Five seemingly constant variant strains have thus been produced by cultivation of the nor-

mal strain on zinc-containing media. The principal distinguishing characteristics of the growth of the parent and variant strains on potato-dextrose-agar medium are indicated in Table 1. It is seen that strains IIIs and IVs are apparently identical and differ from the normal only in their slower growth-rate, whereas Is and IIs, likewise apparently identical, differ further from the normal by a lack of pigmentation and by the even character of the marginal growth. Strain Vs bears no resemblance to the parent type. Although the strains have remained constant for a period of over a year, it is possible that some or all of them may vary further or revert to normal in time.

Table 1. Distinguishing characters of the parent and variant strains.

Culture	Source	Growth rate	Pigmentation	Marginal growth	Sporulation
II (Parent) III (Parent)	Main growth from $ZnCl_2$ inoculum disc. (See text) Main growth from single spore colony on $Zn(NO_3)_2$ medium.	+++	+	Irregular	+
Is (Sector) IIs (Sector)	Sector from inoculum disc colony on $Zn(NO_3)_2$ medium. Slow growth from $ZnCl_2$ inocolum disc (See text).	++	—	Regular	+
IIIs (Sector) IVs (Sector)	Sector from single spore colony on $Zn(NO_3)_2$ medium. Sector from single spore colony on $Zn(NO_3)_2$ medium.	++	+	Irregular	+
Vs (Sector)	Outgrowth from inoculum disc colony on $ZnSO_4$ medium.	+	—	Irregular	—

Single-spore Studies.

In the preceding work only mass-transfer cultures of the parent and variant types were studied, but it is evident that either mixed cultures or heterocaryotic strains[1]) might be carried indefinitely by mass-transfer subculturing. If, however, the different types were found to remain constant through several consecutive single-spore culture-series, their purity and homocaryotic nature could be reasonably assumed. To this end, 20 isolated germinating microconidia of each strain were planted on potato-dextrose-agar plates, 4 single conidia being planted on each plate. In those cases in which all the resultant colonies were typical, 20 more single conidia were isolated from a random colony and planted on potato-dextrose-agar plates as before. When all the resultant colonies were again true to type, a third set of 20 single conidia was isolated from a colony taken at random from the second set and planted on potato-dextrose plates. If, now, all of these colonies were typical, it was assumed that the strain was pure and homocaryotic.

[1]) For a discussion of heterocaryosis see Hansen and Smith: The mechanism of variation in imperfect fungi: Botrytis cinerea. (Phytopathology. Vol. 22. 1932. p. 953—964.)

When, however, any one of the single-spore colonies of a series appeared to be off-type, both the aberrant colony and a random typical colony were subjected to the complete single-spore analysis outlined above. All cultures listed in Table 1, save the non-conidial strain Vs, were tested in this manner. The results of this work are indicated in Fig. 2.

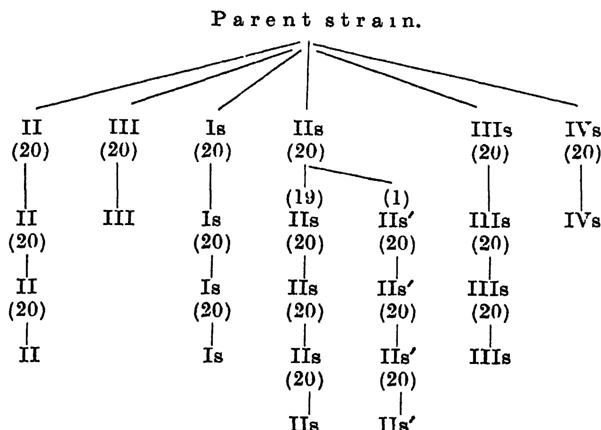


Fig. 2. Diagrammatic representation of the results of the single-conidium analyses. Strains II and III are of the parent type; Is, IIs, IIs′, IIIs, and IVs are variants. The numbers in parentheses indicate the number of single-conidium cultures in each series.

In the first set of single-spore cultures it was found that all those of the parent type (II and III) were alike. Further single-spore culturing of III was therefore discontinued. Similarly, all single-spore cultures of IIIs and IVs were found to be alike, and further work with the latter was discontinued. All of the Is and 19 of the IIs colonies were alike, but the remaining colony of the latter was markedly different, having very sparse mycelial development and a somewhat slower growth-rate than IIs. Analysis of Is was therefore completed separately, and a random typical colony of IIs and the aberrant colony (IIs′) were given complete single-spore analyses. The strains analyzed are illustrated in Fig. 3.

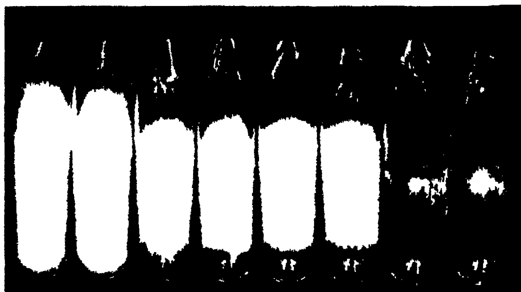


Fig. 3. Single-conidium cultures of parent and variant strains. Left to right: Two cultures each of III, IIIs, IIs, and IIs′ on potato-dextrose-agar slopes.

The results of the single-spore analyses seem sufficient to justify the conclusion that both parent and sector strains were pure and homocaryotic. The appearance of the aberrant colony IIs′ does not, in the opinion of the writer, invalidate this conclusion. Had this very weak, slow-growing strain been present in the original transfer from the sector, it is probable that it would subsequently have been eliminated in the numerous

consecutive masstransfer sub-cultures which were made from the marginal growth of young colonies of IIs prior to the single-spore analysis.

Summary and Conclusions.

A single-spore strain of a Fusarium species has been studied intensively over a period of two years. No variation or sectoring has been observed in hundreds of single-spore and mass-transfer colonies of this strain on standard laboratory media. Furthermore, sectoring has not occurred on media containing great excesses of neutral chlorides, sulfates or nitrates, nor on Coons' medium adjusted to high acidity (p_H 2.5). Sectors have frequently appeared, however, in both single-spore and mass-transfer colonies of this strain when cultivated on media containing high concentrations of chloride, sulfate or nitrate of zinc. The evidence indicates that the sectoring was induced by the action of the zinc ion on the nuclei or cytoplasm of cells of the parent mycelium.

Two of the sectors studied have given rise to similar strains differing from the parent only in the possession of a markedly slower growth-rate. Two other sectors have given rise to similar strains differing from the parent not only in the possession of a slower growth-rate, but also in complete lack of pigmentation and in the possession of regular marginal growth.

The parent and the variant strains have been shown by single-spore culture studies to be pure and homocaryotic.

A single isolated spore of one of the variant strains has given rise to a further variant strain. In the opinion of the writer, this spore was neither an impurity nor a variant produced by the action of zinc ion, but rather the result of an aberrant mitosis or a "spontaneous" gene mutation occurring during or shortly prior to the formation of the spore.

It is suggested that the mechanism of action of the zinc ion lies either in an alteration of the self-perpetuating, extra-nuclear inclusions of the cytoplasm of the parent cells, or in an alteration of the genic constitution of the nucleus.

The writer wishes to express his gratitude to Prof. H. N. Hansen, whose suggestions and criticisms have proved invaluable in the performance of this work and in the preparation of the manuscript.

Reference.

1. Arcichovskij, V., Zur Frage über den Einfluß von $ZnSO_4$ auf eine Reihe von Generationen von Aspergillus niger. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. 1908. S. 430.) — 2. Barnes, B., On variation in Thamnidium elegans Lk. induced by the action of high temperatures. (Trans. Brit. Mycol. Soc. Vol. 19. 1935. p. 291—314.) — 3. Brierley, W. B., On a form of Botrytis cinerea with colorless sclerotia. (Phil. Trans. Roy. Soc., London, Ser. B. Vol. 210. 1920. p. 83—114.) — 4. Brown, W., Studies in the genus Fusarium. IV. On the occurrence of saltations. (Ann. of Bot. Vol. 40. 1926. p. 223—243.) — 5. Christensen, J. J., The influence of temperature on the frequency of mutation in Helminthosporium sativum. (Phytopathology. Vol. 19. 1929. p. 155—162.) — 6. Dickinson, S., The nature of saltation in Fusarium and Helminthosporium. (Minn. Agr. Exp. Sta. Techn. Bull. 88. 1932. p. 3—39.) — 7. Dickson, H., The effects of X-rays, ultra violet light and heat in producing saltants in Chaetomium cochliodes and other fungi. (Ann. of Bot. Vol. 46. 1932. p. 389—404.) — 8. Dickson, H., Saltation induced by X-rays in seven species of Chaetomium. (Ann. of Bot. Vol. 47. 1933. p. 735—754.) — 9. Dodge, B. O., A recessive factor lethal for ascospore formation in Neurospora. (Bull. Torrey Bot. Club. Vol. 62. 1935. p. 117—128.) — 10. Galloway, L. D., The stimulation by dilute antiseptics of "sectoring" in mold colonies. (Trans.

Brit. Mycol. Soc. Vol. 18. 1933. p. 161—162.) — 11. Greaney, F. J., and Machacek, J. E., The production of a white fertile saltant of Helminthosporium sativum by means of ultra-violet radiation. (Phytopathology. Vol. 23. 1933. p. 379—383.) — 12. Haenicke, A., Vererbungsphysiologische Untersuchungen an Arten von Penicillium und Aspergillus. (Ztschr. f. Bot. Bd. 8. 1916. S. 225—337.) — 13. Heldmaier, C., Über die Beeinflußbarkeit der Sexualität von Schizophyllum commune Fr. und Collybia velutipes Curt. (Ztschr. f. Bot. Bd. 22. 1930. S. 161—220.) — 14. Hüttig, W., Die Sexualität bei Glomerella lycopersici Krüger und ihre Vererbung. (Biol. Zentralbl. Bd. 55. 1935. S. 75—83.) — 15. Mitra, M., Saltation in the genus Helminthosporium. (Trans. Brit. Mycol. Soc. Vol. 16. 1931. p. 115—127.) — 16. Schiemann, E., Mutationen bei Aspergillus niger van Tiegham. (Ztschr. f. ind. Abst.- u. Vererb.-Lehre. Bd. 8. 1912. S. 1—34.) — 17. Tai, F. L., Sex-reaction linkage in Neurospora. (Mycologia. Vol. 28. 1936. p. 24—30.) — 18. Tu, Chih., Physiologic specialization in Fusarium spp. causing head-blight of small grains. (Minn. Agr. Exp. Sta. Techn. Bull. 74. 1930. p. 3—24.) — 19. Watermann, H. J., Mutationen bei Penicillium glaucum und Aspergillus niger. (Ztschr. f. Gar.-Physiol. Bd. 3. 1913. S. 1—14.) — 20. Wulker, H., Untersuchungen über Tetradenaufspaltung bei Neurospora sitophila Sh. et Dodge. (Ztschr. f. ind. Abst.- u. Vererb.-Lehre. Bd. 69. 1935. S. 210—248.) — 21. Zickler, H., Genetische Untersuchungen an einem heterothallischen Askomyzeten (Bombardia lunata nov. sp.). (Planta [Arch. Wiss. Bot.]. Bd. 22. 1934. S. 573—613.)

Referate.

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Ehrismann, O., Über die differentialdiagnostische Bedeutung äskulinspaltender Streptokokken. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 464—473.)

Eingehende Beschreibung von 12 Streptokokkenstämmen, die von den „typischen“ äskulinspaltenden Enterokokken bis zu uncharakteristischen Mundstreptokokken differentialdiagnostisch fließende Übergänge zeigen. Übergangsformen sind offenbar ebenso häufig wie die sog. „echten Enterokokken“. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Verona, O., De la variante „R“ de Sarcina lutea (Fl.) Lehm et Stubenrath. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 8. 1936. p. 33—34.)

Von einer spontan entstandenen R-Form von Sarcina lutea wurden einige morphologische und physiologische Eigenschaften untersucht und zu denen der ursprünglichen S-Form in Vergleich gesetzt. Sie entsprechen den für R-Formen anderer Arten gefundenen typischen Merkmalen.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Grasser, H., Beitrag zur Wirkung von Ultrakurzwellen auf Bacterium coli. (Med. Klinik. Jahrg. 32. 1936. S. 706—708.)

Mit einem Röhrenapparat wurde die Wirkung der 6-m-Welle auf Bact. coli commune geprüft. Die Spannung betrug 18—19 Volt, die Behandlungsdauer 3—35 Min. Soweit eine Wärmewirkung ausgeschlossen wurde, blieben die Keime in morphologischer und physiologischer Hinsicht völlig unbeeinflußt. Lediglich bei hohen Temperaturen kam es infolge von reiner Wärmewirkung zum Stillstand des Wachstums.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Endres, G., Beiträge zur Kenntnis der biologischen Bindung des Luftstickstoffes. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 560.)

In Kulturen von Azotobacter chroococcum entstehen während des Wachstums und der Stickstoff-Fixation der Bakterien Stickstoffverbindungen, aus denen sich durch hydrolytische Spaltung Hydroxylamin gewinnen läßt. In den Kulturlösungen sind Carboxingruppen vorhanden. Auch bei der Assimilation von Nitrit oder Nitrat läßt sich die Carboxingruppe in den Kulturlösungen nachweisen. Azotobakter ist also imstande, sowohl während der N_2-Fixation als auch während der NO_2- bzw. NO_3-Assimilation einen Teil des assimilierten Stickstoffes in die Hydroxylaminstufe überzuführen. Heuß (Berlin).

Gastellani, E., Recherches sur l'action de l'eau pesante à de faibles concentrations sur quelques microorganismes. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 396—400.)

Schweres Wasser (D_2O) in Konzentrationen von 0,05, 0,5, 2 und 10% übte auf die Entwicklung von Bacterium radicicola und Bact. fluorescens liquefaciens nur in der stärksten der angewandten Konzentrationen eine schwach hemmende Wirkung aus. Deutlicher war der Einfluß des schweren Wassers auf die Pilze Fusarium herbarum und Rhizoctonia spec. 0,05 und 0,5% D_2O wirkten hier stimulierend, während 10% für beide Pilze schon zweifellos giftig waren.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Kimata, M., Decomposition of Glucosamin by Pseudomonas fluorescens. (Bull. Japan. Soc. Scient. Fisheries. Vol. 3. Nr. 6. 1935. p. 346—348.) [Japanisch, engl. Zusfassg.]

Ein 0,8% Glukosamin-Hydrochlorid enthaltendes synthetisches Medium wurde bei 28° C der Zersetzung durch Pseudomonas fluorescens überlassen. Es wurden Methylglyoxal, Brenztraubensäure, Milchsäure, Apfelsäure und außerdem wahrscheinlich Ameisen- und Essigsäure gebildet.

C. R. Baier (Kiel).

Kimata, M., Decomposition of Fish Muscle and Rate of Growth of Bacteria in Relation to the Number of Seeding Bacteria. (Bull. Japan. Soc. Scient. Fisheries. Vol. 4. Nr. 4. 1935. p. 215—216.)

Verschiedene Mengen einer 48stünd. Bouillonkultur von Pseudomonas fluorescens wurden in autoklavierte Fischmuskel-Suspensionen geimpft und fortlaufend die Keimzahlen und die Mengen der gebildeten flüchtigen Stickstoffbasen bestimmt. Aus der graphischen Darstellung der Ergebnisse geht hervor, daß in den ersten 24 Std. die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien mit steigender Aussaatmenge sinkt. Die endgültige (maximale) Keimzahl, die in allen Fällen gleich ist, wird bei großer Aussaat eher erreicht als bei geringer. Ebenso wie die Gesamtmenge der Bakterien ist die Menge der flüchtigen Stickstoffbasen von der Aussaat unabhängig. Die Geschwindigkeit der Bildung flüchtiger Stickstoffbasen folgt dem Gesetz der monomolekularen autokatalytischen Reaktionen.

C. R. Baier (Kiel).

Kimata, M., Effect of Halogen Ions upon the Growth Rate of Bacteria and the Decomposition of Fish

Muscle. (Bull. Japan. Soc. Scient. Fisheries. Vol. 4. Nr. 5. 1936. p. 294—296.)

Pseudomonas fluorescens wurde in Fischmuskel-Suspensionen mit verschieden hohem Gehalt an Natriumhalogeniden geimpft und wiederholt die Keimzahlen und die Bildung fluchtiger Basen bestimmt. Die hemmende Wirkung der Halogenide nimmt ab in der Reihenfolge F' > J' > Br' > Cl'. Sie beginnt fur F' bei einer Konzentration von 0,0005 M. Geringste Mengen J' (0,0025—0,01 M) und Cl' (0,01—0.1 M) stimulieren die Vermehrungen leicht. Die hemmende Wirkung von Cl' beginnt bei 0,1 M.

C. R. Baier (Kiel).

Perotti, R., Action du charbon sur les microorganismes. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 451—452.)

Verf. nimmt zu einer Veroffentlichung ukrainischer Autoren Stellung und macht ihnen den Vorwurf, daß sie seine eigenen, bereits fruher veroffentlichten ausgedehnten Untersuchungen über die fördernde Wirkung pulverisierter pflanzlicher und tierischer Kohle auf Mikroorganismen nicht berücksichtigt haben. Bortels (Berlin-Dahlem).

Bernhauer, K., Görlich, Br. und Köcher, E., Über die Bildung C-vitamin-ähnlicher Substanzen durch Pilze und Bakterien. I. (Biochem. Ztschr. Bd. 286. 1936. S. 60—65.)

In Rohrzuckerkulturen von Aspergillus niger wurde die Bildung einer reduzierenden Substanz beobachtet. deren Verhalten die Vermutung zuläßt, daß es sich um einen der Ascorbinsäure ähnlichen Stoff handelt. Es wurden die Kulturbedingungen beschrieben, die eine größtmogliche Ausbeute dieser Substanz gewährleisten.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Scheunert, A. und Schieblich, M., Über Vitaminbildung durch Aspergillus oryzae. (Biochem. Ztschr. Bd. 286. 1936. S. 66—71.)

Auf dem üblichen vitaminfreien Nährstoffgemisch für Ratten wurde nach Verdünnung mit Wasser und Zusatz von Salzen Aspergillus oryzae gezüchtet. Die gesamte Masse kam dann nach vorsichtiger Trocknung als Zusatznahrung zur Verwendung, wobei sie sich als sehr reich an Vitamin B 1 und dem Vitamin B 2-Komplex erwies. Vitamin A war von dem Pilz nicht gebildet worden. Bortels (Berlin-Dahlem).

Bernhauer, K. und Iglauer, A., Über die Säurebildung aus Zucker durch Aspergillus niger. VI. Mitt. Faktoren der Zitronensäure-Anhäufung. (Biochem. Ztschr. Bd. 286. 1936. S. 45—59.)

Unbedingt einzuhaltende Versuchsbedingungen zur Erzielung einer größtmöglichen Ausbeute an Zitronensäure werden eingehend beschrieben. Als günstigste Zuckerkonzentration wurden 17,5—20% ermittelt, wobei durchschnittlich 70% des verabreichten Zuckers in Zitronensäure umgewandelt wurden. Auch Schichthöhe der Nährlösung und ihre Zusammensetzung sowie Beschaffenheit des Glases der Kulturgefäße und das Alter der verimpften Sporen wurden in ihrer Bedeutung für die Zitronensäurebildung untersucht. Trotz möglichster Konstanthaltung optimaler Bedingungen ist aber dennoch mit einer Variationsbreite von 20% zu rechnen.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Yale, M. W., and Pederson, C. S., Optimum temperature of incubation for standard methods of milk analysis as influenced by the medium. (Amer. Journ. of Public Health. Vol. 26. 1936. p. 344—349.)

Wie schon früher festgestellt wurde (siehe Pederson and Yale, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, Bd. 94. 1936. S. 276), wird durch eine Veränderung in der Zusammensetzung des Standardagars auch die Temperatur beeinflußt, bei der innerhalb 48 Std. die maximale Kolonienzahl erreicht wird.

Als Medium dienten der von Bowers and Hucker angegebene Trypton-Glukose-Magermilchagar (siehe Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 95. 1936. S. 269) und der Standard-Peptonagar. Mit jedem dieser Nährböden wurden in der Regel 32—38 Duplikat-Agarplatten einer jeden Milchprobe hergestellt. 1—3 Platten wurden jeweils bei folgenden Temperaturen bebrütet: 18°, 21°, 45° und 55° C, und jeweils 5 Platten bei ungefähr 25°, 28°, 30°, 32°, 34°, 37° und 39° C. Die Durchschnitts-Kolonienzahlen wurden bei jeder Bebrütungstemperatur als Prozente des maximalen Durchschnittsergebnisses berechnet. Auf dem Tryptonagar wurden mit Rohmilch die höchsten Kolonienzahlen bei einer 2tägigen Bebrütung wenig unter 30° C erreicht, während bei der pasteurisierten Milch das Maximum an Kolonienzahlen etwas über 31° C lag. Was die Bebrütungstemperatur von 37° C während 48 Std. betrifft, so ist diese Temperatur sowohl mit dem Tryptonagar, als auch mit dem augenblicklich noch vorgeschriebenen Standardagar äußerst unzweckmäßig: 1. weil mit ihm nur 50% des durchschnittlichen Maximums erreicht wird; 2. weil die absteigende Kurve bei dieser Temperatur am steilsten ist und infolgedessen Fehler wegen Schwankungen der Bebrütungstemperatur sich viel schlimmer auswirken als bei 30—32° C und 3. weil der Prozentsatz des maximalen 48-Std.-Ergebnisses zwischen den einzelnen Milchproben ungemein stark variiert. Auf der anderen Seite erwies sich eine Bebrütungstemperatur von 32° oder etwas weniger ebenso zweckmäßig beim Tryptonagar wie bei dem gegenwärtig vorgeschriebenen Standardagar, wobei sich allerdings herausstellte, daß bei den pasteurisierten Milchproben die maximalen Kolonienwerte auf Tryptonagar um 44% höher waren als auf Standard-Peptonagar. Auf Tryptonagar entwickelten sich während der 48 Std. nicht bloß mehr Kolonien, sondern sie wuchsen auch besser und rascher als auf dem offiziellen Standardagar.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Thompson, R., The distribution of Brucella abortus in the infected udder. (Canadian Public. Health Journ. 1934. p. 229.)

Wenn die Ausscheidung von Bangschen Bazillen in Kuhmilch untersucht wird, sollte jedes Viertel des Euters unabhängig voneinander geprüft werden. Man findet den Bangschen Bazillus oft im rechten hinteren Viertel. Der Bazillus wird dauernd abgesondert, nicht aber wenn andere Infektionen eintreten, und er ist nicht zu finden bei Anwesenheit klinischer Mastitis.

Davis (Reading).

Thompson, R., The etiology of undulant fever in Canada: Brucella abortus isolated from two cases in Quebec. (Canadian Med. Journ. Vol. 30. 1934. p. 485.)

Der Bangsche Bazillus wurde aus dem Blute von zwei Maltafieberkranken isoliert, die infizierte Kuhmilch getrunken hatten.

Davis (Reading).

Guthrie, E. S., Scheib, B. J., and Stark, C. N., The effect of certain factors upon the keeping quality of butter. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 267—278.)

Die zum Versuch stehenden Butterstücke samt Rahm (insgesamt 576 Proben) wurden einer eingehenden chemischen und bakteriologischen Analyse unterzogen, desgl. einer Prüfung auf Geschmack und Geruch. Die Auf-

bewahrungstemperaturen waren 5°, 10° und 24° C. Die Zahl und Art der Bakterien während der verschiedenen Stadien wurden auf Milchfett-Agar, Tributyrin-Agar und Magermilch-Agar bestimmt. Abgesehen von den Bakterien, wurde auch die Wirkung von Enzymen, Säure und Salz nachgeprüft. Die erhaltenen Ergebnisse berechtigen zu folgenden Schlüssen: Durch die Pasteurisierung des Rahmes bei 74° C während 30 Min. werden die meisten der schädlichen natürlichen Milchenzyme zerstört, nicht jedoch bei 62,8° C. Der hemmende Einfluß des Salzes auf die Tätigkeit der Enzyme ist nur ein sehr geringer, wenn er überhaupt vorhanden ist, dagegen bewirkt höhere Wasserstoffionenkonzentration (p_H 4,7 oder weniger) eine vollständige Inaktivierung der Milchenzyme. — Was die Bakterien betrifft, so ist keines der nicht-sporenbildenden Stäbchen, das für die Verderbnis von Butter in Frage kommen könnte, in der Lage, die angegebene Temperatur von 74° C während 30 Min. zu überleben. Bei Abwesenheit anderer Faktoren scheint eine direkte Beziehung zwischen der Menge der fett- und kaseinspaltenden Bakterien und der verringerten Haltbarkeit von Butter zu bestehen. Die bereits bekannte hemmende Wirkung von Säure und Salz auf das Wachstum der Bakterien in Butter konnte bestätigt werden. Sieht man dagegen von den übrigen, die Haltbarkeit der Butter ungünstig beeinflussenden Faktoren ab, so ergab sich, daß sowohl die Säure allein, als auch das Salz allein bei der Lagerung einen Rückgang der Qualität verursacht, desgl. natürlich erst recht die kombinierte Wirkung von Säure und Salz. Selbstverständlich verdarben alle Butterproben um so rascher, je höher die Aufbewahrungstemperaturen gewesen war. K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Rudert, A. und Engelhard, C., Der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den Zuckerabbau bei der Hefegärung. (Ztschr. f. d. ges. Brauwesen. Bd. 59. 1936. S. 33—36, 37—40, 41—44, 45—47, 53—56, 57—64.)

Es wurde der Abbau der Rohmaltose während der Gärung an einigen Malzwürzen, denen verschiedene Mengen von Milchsäure zugesetzt waren, unter Berücksichtigung des p_H-Abfalls verfolgt. Trotz der großen Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung, im Extrakt, Pufferungsvermögen usw. ließen ungesäuerte wie gesäuerte Würzen im Zuckerabbau und im p_H-Abfall während der Gärung große Ähnlichkeiten erkennen. Geringe Säureschwankungen in den ursprünglichen Würzen waren im End-p_H-Wert fast vollkommen ausgeglichen. Größere Säuremengen ließen ihn um so mehr sinken, je mehr Säure man zufügte. Geringe Säuremengen hinderten den normalen Zuckerabbau nicht. Größere Säuremengen hemmten ihn und zwar um so starker, je größer die Säuremengen waren, die den Würzen zu Beginn der Gärung zugefügt wurden. Eine Förderung der Gärtätigkeit der verwendeten Brauereihefe durch Säurezusatz wurde nicht beobachtet. Allgemein fiel der p_H-Anstieg gegen Ende der Gärung auf. Nicht nur die ungesäuerten, sondern auch die gesäuerten Würzen zeigten den Säureverlust. Die Säureverminderung verlief bei den einzelnen Würzen und ihren gesäuerten Proben im allgemeinen nicht gleichmäßig. Bei letzteren übertraf er meist die Menge der während der Gärung gebildeten Säure, so daß der End-p_H-Wert größer war als der Anfangs-p_H-Wert. Die Säuremaxima der einzelnen gesäuerten Würzen liefen zeitlich mit den Säuremaxima der ungesäuerten Würze ungefähr zusammen. Nach der ersten halben Stunde beobachtete man bei sämtlichen gärenden Würzen ein Ansteigen des Rohmaltosegehaltes, der auf der Hydrolyse des in den Würzen vorhandenen Rohrzuckers beruht. Nur ein Teil der Saccharose wurde dabei invertiert.

Bei einem Vergleichsversuch mit reiner Maltoselösung beobachtete man ganz andere Verhältnisse. Schon die Gärung der ungesäuerten Probe zeigte ein von den Malzwürzen stark abweichendes Bild. Der Puffermangel beschleunigte den p_H-Abfall und ließ den End-p_H-Wert viel tiefer sinken. Infolge des Mangels an Nährstoffen für die Hefe blieb die Vermehrung der Zellen und damit auch die Erhöhung des Enzym-

gehaltes aus, der Zuckerabbau ging deshalb nicht so rasch von statten wie in der Wurze. Bei den gesauerten Garproben der Maltoselosung hemmten entsprechend gleich hohe Sauregaben den Zuckerabbau viel starker als bei den Wurzen. Die Gartatigkeit verlangsamte sich wesentlich starker und wurde eher zum Erliegen gebracht als bei den Wurzen H e u ß (Berlin).

Enders, C., Über Trübungen in Wurze und Bier. I. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 201—203, 211—216.)

Aus dem Prinzip der objektiven Absorptionsmessung mit dem Lange-Elektrokolorimeter wurde eine Methode zur Trubungsmessung in Wurzen und Bieren entwickelt. Mit ihrer Hilfe konnte nachgewiesen werden, daß die in infizierten Wurzen auftretende Trubung zum großten Teil durch die Mikrobenleiber selbst, zum geringeren Teil durch die infolge ihrer Lebenstätigkeit erzeugte Säuerung hervorgerufen wird. H e u ß (Berlin).

Nielsen, N. und Lund, A., Untersuchungen über die Assimilation der formoltitrierbaren Stickstoffverbindungen der Bierwurze. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 217—219.)

Durch Verdünnung von Wurze mit stickstofffreier Nährlösung, so daß der Stickstoff ins Minimum kam und der gesamte assimilierbare Stickstoff aufgenommen wird, konnte nachgewiesen werden, daß nicht der gesamte formoltitrierbare Stickstoff der Wurze, sondern nur 50—70% davon durch die Hefe assimiliert werden konnen. Der von der Hefe assimilierbare Anteil des formoltitrierbaren Stickstoffes ist sehr leicht aufnehmbar. In einer nichtverdünnten Würze, in der der assimilierbare Stickstoff also in beträchtlichem Überschuß vorhanden ist, werden 50—56% des Formolstickstoffes assimiliert. Die Hefe assimiliert also vorzugsweise Formolstickstoff. Die Hefe selbst scheidet ubrigens bedeutende Mengen Formolstickstoff aus. H e u ß (Berlin).

Schild, E. und Geiger, O., Über den Endvergärungsgrad von Bierwurzen und eine exakte Methode zur Bestimmung desselben. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 241—245.)

Der Endvergärungsgrad von Würzen liegt in der Praxis häufig über dem im Laboratorium festgestellten Wert. Die Ursache dieser Erscheinung liegt darin, daß im Laboratoriumsversuch bei Vergärung oder Würzen mit mehr als 10% Extrakt der entstehende Alkohol die Gärkraft der Hefe so stark hemmt, daß nach dreitägiger Versuchsdauer die letzten Reste vergärbarer Substanz noch nicht verarbeitet sind. Die dann aus der Hefe ins Bier ubergehenden Autolysenprodukte verhindern eine weitere Abnahme des scheinbaren Extraktes. Würzen mit weniger als 4% Extrakt enthalten nicht mehr genug Nährstoffe, um die Hefe zu rascher und kräftiger Entwicklung zu bringen. Um den höchstmöglichen Vergärungsgrad zu ermitteln, muß man die Würzen durch Verdünnen oder Eindampfen auf eine Konzentration von 4—10% bringen. Nach 72 Std. ist in allen Fällen die Endvergärung erreicht. Für genaue Bestimmungen müssen außerdem die Volumenprozente zugrunde gelegt werden. H e u ß (Berlin).

Brischke, G. W. A., Die Ergebnisse von Eignungsprüfungen an den Würze-Plattenkühlern „Diskus". (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 209—211, 219—224, 227—232.)

Die Eignung der Diskus-Plattenkühler zur Würzekühlung wurde bewiesen. Besonders bewährte sich die Apparatur bei der direkten, luftlosen Kühlung der Ausschlagwürze nach erfolgter Heißfiltration. Bei verkürzter Arbeitszeit erhielt man eine keimfreie Anstellwürze und bei Vorhandensein einer an sauerstoffarme Würzen gewöhnten Hefe schneidige, geschmacksreine Biere mit hoher Vergärung, ausgezeichneter Haltbarkeit und Schaumhaltigkeit. Die Versuche mit diesen Plattenkühlern zeigten u. a. auch deutlich, daß es erhebliche Unterschiede zwischen aerob und anaerob geführten Betriebshefen gibt. Heuß (Berlin).

Preininger, V., Desinfektion und Desinfektionsmittel in der Gärungsindustrie. (Der böhm. Bierbrauer. Bd. 63. 1936. S. 325—336.)

Nach einer allgemeinen Übersicht über Art und Wirkungsweise von Desinfektionsmitteln berichtet Verf. über eigene experimentelle Versuche mit den saueren Mitteln Montanin und Fluidol A. F., mit den alkalischen Mitteln Antifermentin, Desbyn, ätzendes Neomoskan und dem neutralen Formalin. Der Hauptbestandteil von Montanin und Fluidol ist Kieselfluorsäure, von Antifermentin, Neomoskan und Desbyn Natriumhypochlorit und Natronlauge, die in Berührung mit organischen Stoffen Chlor bzw. Chlor und Stickstoffoyxde als wirksame Bestandteile frei machen. Die Versuche sollten die Verwendbarkeit dieser Mittel in der Brennerei und Essigindustrie klären. Sie wurden in einer Konzentration von 0,25, 0,5, 1 und 2% gegenüber Brennereihefen, Essigbakterien und Penicillium glaucum und infizierten Holzstückchen geprüft, ferner wurde auch die Menge jedes Mittels ermittelt, die zur Verhinderung einer Gärung süßer Kartoffelmaische mit Kulturhefe XII notwendig ist.

Von den geprüften Mitteln entsprach am besten das neutrale Formalin, das sowohl flüssig als auch gasförmig benutzt werden kann. Ihm zur Seite stellt sich das alkalische Antifermentin, die saueren Mittel Fluidol und Montanin, bei denen aber beachtet werden muß, daß sie zum Teil Holz, zum Teil Metalle angreifen. Desbyn und Neomoskan erwiesen sich als Mittel von nur geringer Wirksamkeit. Heuß (Berlin).

Fink, H. und Lechner, R., Über die Futterhefengewinnung in Holzzuckerlösungen. III. Über den natürlichen Stickstoffgehalt der Holzzuckerwürzen. (Biochem. Ztschr. Bd. 286. 1936. S. 83—90.)

Die hohen Ausbeuten an Hefeeiweiß bei der Züchtung von Torula utilis in Holzzuckerlösungen sind nach Ansicht der Verff. nicht nur der starken Belüftung der Kulturen, sondern auch den aus dem Holz stammenden Stickstoffverbindungen zu verdanken. Denn ohne diese Verbindungen aus dem Holzeiweiß mit Ammonsalz als alleiniger Stickstoffquelle ist der Hefegewinn geringer. Es wird deshalb vorgeschlagen, die bei der Verzuckerung des Holzes anfallenden stickstoffreichen Fraktionen für die Hefegewinnung und die stickstoffarmen für die Alkoholgewinnung zu verwerten.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Romaschkewitsch, I. F., Die Wirkung des Chlors, Schwefels, Natriumbisulfats und der Braunkohle auf die Stallmistzersetzung. (Aus den Arbeiten des Laboratoriums

für *organische* Düngemittel WIUA.) (Die Chemisation d. soz. Landwirtschaft. Bd. 11/12. 1935. S. 34—44.) [Russ.]

Versuche der Stallmistbereitung unter der Wirkung von gasförmigem Chlor, von Schwefel, Natriumsulfat und Braunkohle, die in Glasgefäßen angestellt wurden, haben zu folgenden Ergebnissen geführt: die Anwendung von Chlor, Schwefel und Natriumsulfat bewirkte eine bedeutende Verminderung der Verluste an organischer Masse und an Stickstoff im Stallmist, und zwar betrug der Verlust an organischer Masse und an Stickstoff bei gewöhnlichem Stallmistbereitungsverfahren im Laufe von zwei Monaten 32,48% bzw. 26,76%, bei der Behandlung mit 1 proz. Cl_2 stellte er sich aber nur auf 5,98% bzw. 1,05%, und bei einer solchen mit 2 proz. Cl_2 — auf 5,37% bzw. 2,67%; bei der Behandlung mit 2% S betrug der Verlust an organischer Masse und an N 9,29% bzw. 2,28%, bei einer solchen mit 7% $NaHSO_4$ — 5,31% bzw. 0,2% usw. Die Untersuchung der Mikroflora in gewöhnlichem und in mit 0,5% S behandeltem Stallmist ergab folgende Resultate: die Gesamtzahl der Bakterien betrug am 18. Tage nach dem Versuchsbeginn in gewöhnlichem Stallmist 540 Millionen, in dem mit 0,5% S behandelten aber nur 44 Millionen; am 33. Tage nach dem Versuchsbeginn stellte sich ihre Menge entsprechend auf 270 und 13 Millionen. Was nun die konservierende Wirkung der Braunkohle anbetrifft, so war diese sehr gering, ja in manchen Fällen betrug der Stickstoffverlust im Stallmist mit Kohle sogar mehr als beim gewöhnlichen Stallmistbereitungsverfahren. Die Wirkung des Cl_2-S und $NaHSO_4$ äußerte sich weiter in einer Anhäufung von NH_3 im Stallmist. So betrug der NH_3-Gehalt nach 2 monat. Aufbewahrung in % vom gesamten N: in gewöhnlichem Stallmist — 2,83%, in dem mit Braunkohle — 2,5—4,0%, in dem mit 1 proz. Cl_2 — 32,04%, in dem mit 7 proz. $NaHSO_4$ — 36,66%, in dem mit 2 proz. S — 34,27%.

M. Gordienko (Berlin).

Kan, L. I., Zur Frage über die Bedeckung des Bodens. (Die Chemisation d. soz. Landwirtschaft. Bd. 11/12. 1935. S. 161—166.) [Russ.]

Die Versuche zeigten, daß die Bedeckung des Bodens mit Papier die Bodentemperatur durchschnittlich um 1—2° C erhöht, wobei diese Temperaturerhöhung im Frühling größer ist als im Sommer. Die Bedeckung des Bodens mit Papier schützt die jungen Pflanzen vor Frost, verbessert den Wasserhaushalt des Bodens, indem sie die Feuchtigkeitsschwankungen ausgleicht, und trägt zur Erhöhung des Nitratgehaltes im Boden sowie in Pflanzen bei; außerdem vermindert sie die Verunkrautung bedeutend. Es wurde weiter festgestellt, daß die Bedeckung mit Papier längs der Zwischenreihen (bei unbedeckten Reihen) bessere Resultate als die vollkommene Bedeckung ergibt. Die Bedeckung mit Moostorf sowie mit Sägespänen hat sich bei den Versuchen nicht bewährt. M. Gordienko (Berlin).

Mischustin, E. und Bernard, W., Zur Frage über die Bindung des Luftstickstoffs durch Leguminosen. (Die Chemisation d. soz. Landwirtschaft. Bd. 11/12. 1935. S. 110—116.) [Russ.]

Die stickstoffassimilierende Tätigkeit der Knöllchenbakterien der Leguminosen hängt davon ab, inwieweit diese Pflanzen mit im Boden vorhandenem Stickstoff versorgt sind. So kommt es, daß die Rolle der Knöllchenbakterien auf Sandböden sehr groß ist, während sie auf den an N reicheren Böden bedeutend abnimmt, ja in manchen Fällen gleich Null wird. Bei den Ver-

suchen in der Nordkaukasischen Schwarzerde mit verschiedenen N-mehrenden und -zehrenden Kulturpflanzen wurden nach ihrer Aberntе etwa die gleichen Nitratmengen im Boden gefunden und zwar wie folgt (Nitratmenge in mgr/1 kg Boden): nach Roggen (Winterung) — 20,2; nach Futterkürbis — 20,0; nach Steinklee — 24,3; nach Hafer-Platterbsegemenge — 21,5; nach Schwarzbrache — 68,6. M. Gordienko (Berlin).

Werth, E., Die forstliche Bodenerkrankung durch Rohhumusbildung. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. 16. Jahrg. 1936. S. 37—38.)

Der Verf. wendet sich gegen die Ansicht, daß besonders durch einen Reinanbau von Kiefern und Fichten Rohhumusmassen in so starkem Maße zur Ablagerung gelangen, daß bereits nach wenigen Bestandsgenerationen ein weiterer Waldanbau in Frage gestellt werden soll. Auf Grund eigener Untersuchungen kommt er zu dem Ergebnis, daß sich während eines Zeitraumes von 6—7000 Jahren im günstigsten Fall nur eine Rohhumusschicht von 20 cm gebildet hat. Für die Entstehung von „Trockentorf" spielt das Klima eine ausschlaggebende Rolle. Da dieses aber nicht geändert werden kann, besteht in absehbaren Jahrhunderten keine Gefahr für das Verschwinden des deutschen Waldes. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Keys, A., Christensen, E. H., and Krogh, A., The Organic Metabolism of Seawater with Special Reference to the Ultimate Food Cycle in the Sea. (Journ. Mar. Biol. Ass. Un. Kd., N. S. Vol. 20. Nr. 2. 1935. p. 181—196.)

In bezug auf die Püttersche Theorie wird die Frage behandelt, in welchem Ausmaße die Bakterien die im Seewasser gelösten organischen Stoffe verwerten können. Unter dieser Fragestellung vergleichen Verff. die Bakterienvermehrung und die Sauerstoffzehrung im unfiltrierten und verschieden fein filtrierten Seewasser bei verschiedenen Temperaturen und nach Zusatz von Ammon- und Phosphatsalzen. Bakterienvermehrung und Sauerstoffzehrung sind am stärksten in unfiltriertem Wasser. Die bakterielle Aktivität ist stark abhängig von Temperatur und Alkalinität, weniger von Ammon-, Nitrit- und Nitratgehalt des Wassers. In phosphatreichem Tiefenwasser ist Phosphatzusatz nicht von Bedeutung, wohl dagegen in phosphatarmem Oberflächenwasser. Keimvermehrung und Sauerstoffzehrung werden bereits gehemmt, wenn noch große Ammon- und Sauerstoff-Reserven im Wasser vorhanden sind und nur ein geringer Teil der organischen Substanz zersetzt ist. Im Meere herrscht im allgemeinen ein Gleichgewicht aller Faktoren, das den Bakterien nur eine relativ geringe Aktivität auf Kosten der gelösten organischen Substanz gestattet. Wird dieses Gleichgewicht bei Entnahme von Wasserproben gestört, so setzt eine Steigerung des bakteriellen Stoffwechsels ein, die am plötzlichen Ansteigen der Keimzahl und der Sauerstoffzehrung erkennbar ist. Bemerkenswert und methodisch wichtig ist, daß Wasserproben aus niedrig temperierten Wasserschichten bedeutend geringere Sauerstoffzehrung zeigen, wenn sie sogleich bei 4—5° C aufbewahrt werden, als wenn sie nur für wenige Stunden auf 22° erwärmt und dann wie die anderen bei 5—6° aufbewahrt werden. C. R. Baier (Kiel).

Sobernheim, G. und Mündel, O., Grundsätzliches zur Technik der Sterilisationsprüfung. I. Mitt. Native und Kul-

tursporen der Erdbakterien. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 328—345.)

Untersuchungen an 3 verschiedenen Proben von Gartenerde führten zu dem Ergebnis, daß „native" Erdsporen gegen siedendes Wasser keine größere Widerstandsfähigkeit besitzen als die gleichen, in künstlichen Kulturen gewonnenen Sporenarten. Wenn die Gartenerde im Kochversuch wesentlich resistenter ist als die aus Erde isolierten Sporenbildner, so liegt dies an dem mechanischen Schutz, der den nativen Sporen durch die Erdpartikelchen verliehen wird. Wurden nämlich Kultursporen mit steriler Erde vermischt und darin zur Antrocknung gebracht, so äußerten sie ungefähr die gleiche Kochresistenz wie native Erdsporen. Andererseits verloren die aus einer genuinen Erde mit Wasser unter mehrstündigem Schütteln ausgewaschenen Sporen einen großen Teil ihrer Resistenz; ihre Widerstandsfähigkeit war bei Prüfung unter den gleichen Bedingungen keine merklich größere als die der Kultursporen. Biologische Differenzen spielen demnach bei der verschiedenen Kochresistenz von Gartenerde und Kultursporen keine oder höchstens eine ganz untergeordnete Rolle.

Es wird vorgeschlagen, als Prüfungstest bei Sterilisationsversuchen die „Gartenerde" als ein höchst ungleichmäßiges und ungeeignetes Testmaterial besser durch einen Test von Kultursporen im Emulsions- oder Keimträgerverfahren zu ersetzen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Godfrey, G. H., Control of soil fungi by soil fumigation with chloropikrin. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 246—256, 1 fig.)

Verf. prüfte zunächst im Laboratorium die Wirkung von Chlorpikrin gegen verschiedene Pilze. Es wurden in Kulturen abgetötet: Fusarium sp. von Gladiolen, Phytophthora cactorum von Löwenmaul, Rhizoctonia solani und Sclerotium rolfsii von der Zuckerrübe, Verticillium albo-atrum von der Erdbeere, Dematophora sp. von Apfelbaum- und Armillaria mellea von Pflaumenbaumwurzeln. Auch in Gewächshausversuchen wurden gute Erfolge erzielt. Das Mittel wurde mit einem Injektor in den Boden gebracht und zwar etwa 180 kg (400 pounds) auf 40 a (1 acre). Der Vorteil von Chlorpikrin liegt darin, daß es gegen Nematoden, Insekten und Pilze wirkt und das Auspflanzen ein oder zwei Tage nach der Behandlung vorgenommen werden kann. Chlorpikrin kann nach den Erfahrungen des Verf.s auch für die Sterilisation von Glassachen im Laboratorium verwendet werden.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

ZoBell, C. E., and Feltham, C. B., The Occurrence and Activity of Urea-splitting Bacteria in the Sea. (Science. Vol. 81. Nr. 2096. 1935. p. 234—236.)

Harnstoff-spaltende Bakterien wurden in fast allen Seewasserproben gefunden, jedoch nur in sehr geringer Zahl. Auch in Schlamm wurden sie nachgewiesen, desgleichen in Fischen. 12 verschiedene Stämme wurden isoliert und untersucht. Die meisten unterschieden sich wesentlich von den bisher beschriebenen terrestrischen Urobakterien. Die Mehrzahl wuchs nicht in Medien, die mit Süßwasser angesetzt waren, konnte aber durch allmähliche Überführung daran angepaßt werden. Bei einem Stamm war eine Wirksamkeit der isolierten Urease schon bei + 5° C nicht mehr nachzuweisen, während die Bakterienkultur noch Vermehrung und Ammonbildung bei — 4° C zeigte. Die Tatsache, daß harnstoffspaltende Bakterien noch bei Tempe-

raturen um 0° aktiv sind, ist für das Meer von besonderer Bedeutung, da über vier Fünftel des Wassers dauernd kälter als 3° C ist. Auf Grund ihrer Ammonproduktion und ihres Stickstoffbedarfs werden die isolierten Stämme 3 Gruppen zugeteilt. C. R. Baier (Kiel).

ZoBell, C. E., Bactericidal Action of Sea Water. (Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. Vol. 34. 1936. p. 113—116.)

Es wurde die bakterizide Wirkung von Seewasser u. ä. auf Süßwasser- und Abwasserbakterien untersucht, teils durch Beimpfen von sterilem Seewasser, teils durch Eintauchen der in poröse Porzellangefäße mit Kollodiumüberzug eingeschlossenen Bakterien-Suspensionen und Bestimmung der Keimzahl nach 1—120 Min. Die Bakterien wurden in Seewasser schnell abgetötet, und zwar in unbehandeltem schneller als in Berkefeld-filtriertem und in diesem wiederum schneller als in autoklaviertem. In isotonischer, d. i. 3proz. NaCl-Lösung ist die Absterbe-Rate etwas größer als in synthetischem und autoklaviertem Seewasser, jedoch kleiner als in frischem und Berkefeld-filtriertem Seewasser. Laboratoriumskulturen von Süßwasserbakterien sind resistenter als frisch isolierte Stämme. Diese können an das Seewasser angepaßt werden, erleiden dabei jedoch z. T. morphologische und physiologische Veränderungen. C. R. Baier (Kiel).

ZoBell, C. E., and Anderson, D. Q., Vertical Distribution of Bacteria in Marine Sediments. (Bull. Amer. Ass. Petrol. Geol. Vol. 20, Nr. 3. 1936. p. 258—269.)

In einem einleitenden Kapitel weist P. D. Trask auf die Bedeutung vorliegender und ähnlicher Untersuchungen für das Problem der Entstehung der Erdölmuttergesteine hin. — Die Zahl der Schlammbakterien liegt in den Tausenden bis Millionen und ist bedeutend größer als die der darüber liegenden Wasserschichten. Die Keimzahl und besonders die der Aeroben nimmt mit der Tiefe des Schlammes in den oberen 5 cm stark, darunter langsamer ab. Sie ist unabhängig von Wassertiefe, Wassertemperatur und Entfernung von dem Festland. Sie wird stark beeinflußt vom Gehalt des Schlammes an organischer Substanz. Das Oxydations-Reduktionspotential (Eh) steigt von der Oberfläche des Schlammes zur Tiefe hin an, während gleichzeitig die Größe der Sauerstoffzehrung sinkt. Das Vorkommen und die relative Verteilung verschiedener physiologischer Gruppen wird besprochen.

C. R. Baier (Kiel).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Nisikado, Y., and Yamauti, K., On the spore-germination and the pure-culture of Armillaria Matsutake Ito et Imai the most important edible mushroom in Japan. (Ber. d. Ohara Inst. f. landw. Forsch. Bd. 7. 1936. S. 273—288, 9 Abb.)

Die Basidiosporen von Armillaria Matsutake keimen auf Bodenabkochung-Agar mit 2% Glukose und auf Malzextrakt-Agar. Der günstigste p_H-Wert für die Keimung liegt bei p_H 4—6. Die Basidiosporen beginnen bei 10—15° C zu keimen. Das Optimum liegt bei 24° C und das Maximum bei 26—29° C. Bei der optimalen Temperatur kann erst nach 4—10 Tagen der Beginn der Keimung beobachtet werden. Für die Keimung ist anscheinend viel Sauerstoff erforderlich. Das Myzel wuchs auf Bodenabkochung-Agar, Knops Agar, Sachs Agar mit Glukose und Hopkins Agar.

Das Temperaturminimum liegt bei 5° C, das Optimum bei 24° C und das Maximum bei 30—32° C. Das Myzel wuchs sehr langsam. Nach 30 Tagen hatte die Kultur erst einen Durchmesser von 15 mm erreicht. In Reinkultur wurde Schnallenbildung beobachtet, wenn das Myzel von mehr als 2 Basidiosporen ausging. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Möller, Beizt auch das Mais-Saatgut! (Dtsch. Landw. Presse. 63. Jahrg. 1936. S. 184.)

Verf. empfiehlt die Beizung zur Bekämpfung des Beulenbrandes dort, wo der Mais neu angebaut wird bzw. wo Maisbrand bisher noch nicht beobachtet wurde; Versuche mit Saatgut, das stark mit Gibberella, Diploida und Basisporium befallen war, ergaben, daß durch die Beizung die Keimfähigkeit wesentlich verbessert wird. Verf. ist daher der Ansicht, daß Mais auf alle Fälle mit Trockenbeizmitteln behandelt werden soll.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Murphy, H. C., Effect of crown rust on the composition of oats. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 220—234, 2 figs.)

Verf. beobachtet ein leichtes Ansteigen des Rohproteingehaltes durch die Infektion mit Puccinia coronata. Dieses Ansteigen war mehr von der Dauer als vom Typ der Infektion abhängig. Der stickstofffreie Extrakt wurde vermindert. Die Zusammensetzung der Kornschale wurde nicht beeinflußt. Das Grüngewicht der befallenen Pflanzen wurde bei den anfälligen Sorten Markton und Iogold um 69,3 bzw. 63,6 und bei den resistenten oder fast immunen Sorten Victoria und Bond um 22,2 bzw. 14,7% herabgesetzt. Die Konzentration der unlöslichen Bestandteile, Asche, Stickstoff und durch Säure hydrolysierbare Substanzen wurde je nach der Anfälligkeit der Sorte mehr oder weniger stark heraufgesetzt, und zwar zeigten Ammonium, Amide, Nitrat- und Nitritstickstoff die stärkste Zunahme. Der Anteil an löslichen Bestandteilen, Zucker und Dextrin wurde durch die Infektion vermindert. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Johnston, C. O., Reaction of certain varieties and species of the genus Hordeum to leaf rust of wheat, Puccinia triticina. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 235—245, 1 fig.)

Bei der Untersuchung von einigen Kultursorten und Wildspezies der Gerste im Gewächshaus zeigte sich, daß keine der Sorten oder Spezies stark anfällig gegen Puccinia triticina ist. Bei einigen Sorten und Spezies wurden aber in reichlichem Maße kleine Uredolager gebildet. Pustelbildung wurde fast bei allen botanischen Gruppen der Kulturgerste, am meisten jedoch bei den Sorten von Hordeum intermedium cornutum beobachtet. Von den Wildsorten war Hordeum gussoneanum C. I. 6067 am anfälligsten. H. spontaneum, H. maritimum, H. bulbosum und ein Stamm von H. murinum zeigten bei der Infektion mit 3 physiologischen Formen beschränkte Pustelbildung. H. nodosum, H. jubatum, H. pusillum und H. pusillum pubens waren sehr resistent gegen alle Formen. H. murinum und H. gussoneanum hatte höchst und mäßig resistente Stämme. Die größte Zahl der Sorten und Spezies, die Pustelbildung zeigten, haben 14 bzw. 28 Chromosomen. H. nodosum mit 48 Chromosomen war höchst resistent. Bei Weizen haben die anfälligsten Sorten die höchste und die resistenten die geringste Zahl von Chromosomen.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Tapke, V. F., The influence of seed hulling on loose smut in naturally inoculated oats. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 588—596.)

Verf. untersuchte den Einfluß des Entspelzens auf das Auftreten des Flugbrandes. Durch das Entspelzen wurde der Befall an 10 Sorten, die natürlich infiziert waren, von 2,1—90,2% vermindert. Auf Grund dieser Untersuchungen weist Verf. darauf hin, daß die meist übliche Methode des Infizierens von entspelzten Körnern wenig den natürlichen Verhältnissen entspricht und daher die mit ihr erzielten Ergebnisse kaum praktische Bedeutung haben. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Warner, E. E., Black rot of tomato, Lycopersicum esculentum, caused by Alternaria sp. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 530—549, 8 figs.)

Als Erreger der Schwarzfäule stellte Verf. eine Alternaria fest. Die Hyphen des Pilzes dringen durch die Stigmen oder Wunden in die Frucht ein. Die Verbreitung der Krankheit erfolgt in erster Linie durch den Wind. Befallen wird nur die Frucht. Die Krankheit äußert sich in einem schwarzbraunen ledrigen Flecken, der häufig die halbe Tomate überzieht. Aus diesem Flecken werden Konidien gebildet. Wenn die Frucht stark gefault ist, werden Dauersporen erzeugt. Beim Herabfallen kommen die Konidien und Dauersporen in den Boden. Bei strengem Winter werden die Konidien abgetötet. Die Dauersporen überleben jedoch und rufen im nächsten Jahr die Primärinfektionen hervor.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Towsend, G. R., Bottom rot of lettuce. (Corn. Un. Agric. Exp. Stat. Memoir. 128. 1933. 46 p., 13 figs.)

Die durch Rhizoctonia solani hervorgerufene Stengel- oder Strunkfäule des Salats verursacht im Staate New York jährlich 30% Verluste. Bisher sind keine resistenten oder immunen Sorten gefunden worden. Einige Sorten entgehen der Infektion, weil sie aufrecht wachsen. Die Inkubationszeit beträgt unter optimalen Bedingungen 48 Std. Der Pilz dringt durch die Kutikula oder durch die Stomata ein. Er bildet Sklerotien und widerstandsfähiges Myzel, die ungünstige Verhältnisse überdauern können. Die optimale Temperatur für das Wachstum in Kultur ist 26° C. Geringes Wachstum findet unter 10 und über 32° C statt. Bei Einwirkung einer Temperatur von 38° C 3 Tage lang wird das Myzel abgetötet. Die Fäule tritt stark auf, wenn die mittlere Tagestemperatur über 19,5 und die niedrigste über 10° C liegt. Feuchtigkeit begünstigt das Auftreten der Krankheit, ist aber nicht so wichtig wie hohe Temperaturen. Die Bodentemperatur ist auf das Auftreten der Stengel- oder Strunkfäule nicht von Einfluß. Geregelte Fruchtfolge, Gründüngung und richtige Kulturmaßnahmen vermindern die Verluste durch die Krankheit. Durch kupfer- und schwefelhaltige Mittel konnte die Krankheit nicht bekämpft werden. Mercurioxyd, Kalomel und Äthylmerkuriarsenat schädigten die Pflanzen. Äthylmerkuriphosphat war unschädlich für die Pflanzen und durch eine einmalige Anwendung von 20—25 Pfund (9,07—11,34 kg) auf 1 acre (40,46 a) konnte die Krankheit bekämpft werden. Das Mittel wurde unter die Pflanzen kurze Zeit vor der Ernte gestreut. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Schnellhardt, O. F., and Heald, F. D., A study of the toxic action on gray-mold spores of clearning solutions used

in spray residue removal. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 564—577, 2 figs.)

In den Gefäßen zum Waschen des Obstes, um die Spritzrückstände zu entfernen, sammeln sich in großem Maße die Sporen von Botrytis cinerea, dem Erreger der Graufäule, an. Verff. untersuchten die Einwirkung der üblichen Waschflüssigkeiten bei verschiedenen Temperaturen auf die Sporen. Am besten tötete Natriumsilikat, weniger Salzsäure und am wenigsten Natriumkarbonat die Sporen ab. Bei 49° C war die Wirkung der Lösungen wesentlich besser als bei 26,5° C.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Hodges, F. A., Fungi of sugar beets. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 550—563, 4 figs.)

Verf. untersuchte 5000 Zuckerrüben aus verschiedenen Gegenden der Vereinigten Staaten auf Pilzbefall. Von allen isolierten Pilzen wurden Reinkulturen gemacht. Fusarien waren meistens die Ursache von Lagerfäulen. Eine große Zahl von Pilzen, darunter Fusarien, wurden zum ersten Male an Zuckerrüben festgestellt. 50 Fusarien wurden bestimmt und beschrieben. Phoma betae erwies sich bei den Versuchen als Parasit von geringer Bedeutung. Von den anderen Pilzen waren nur wenige aktive Parasiten.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Guba, E. F., Resistance to Cladosporium fulvum. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 385—386.)

In 2 Tabellen werden die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen über die Resistenz von Sorten und Kreuzungen von Tomaten gegen die Braunfleckenkrankheit (Cladosporium) dargestellt. Die bisherigen Ergebnisse lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß die Züchtung einer großfruchtigen Tomate für den Anbau im Gewächshaus, die gegen Cladosporium fulvum resistent ist, möglich ist.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Rawlins, T. E., and Tompkins, C. M., Studies on the effect of Carborundum as an abrasive in plant virus inoculations. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 578.)

In einer vorläufigen Mitteilung hatten die Verff. (Ibid. 1934) berichtet, daß sich der Infektionserfolg durch Verwendung von Karborundpuder beim Safteinreibeverfahren sehr wesentlich steigern läßt. Die vorliegende Arbeit bringt hierüber ausführliche Belege. Die mit dem Saft bis dahin nur unsicher übertragbaren Vira des spotted wilt von Tomate und Salat, des broad bean mosaic, eines kalifornischen Selleriemosaiks, des Blumenkohlmosaiks und des Zuckerrübenmosaiks lassen sich mit dem neuen Verfahren weit erfolgreicher übertragen, wenn auch ein 100proz. Gelingen höchstens annähernd erreicht wurde. Nach wie vor als nicht übertragbar mit dem Saft erwiesen sich die Vira von zwei Salatkrankheiten und vom Curly top der Zuckerrübe. — Durch die Anwendung des Kristallpuders wird die Zahl der feinen Infektionswunden, die die Epidermiszellen für den Eintritt des Virus nur aufschließen, ohne sie ernstlich zu schädigen, erhöht.

E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Price, W. C., Virus concentration in relation to acquired immunity from tobacco ring spot. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 503.)

Verf. hatte früher gezeigt, daß Tabakpflanzen, die mit dem tobacco ring spot-Virus infiziert werden, zunächst unter starken Erscheinungen

erkranken. Bald gewöhnen sich jedoch die Pflanzen an das Virus und die weiteren Zuwachsteile entwickeln sich völlig normal, obgleich sie das Virus noch enthalten. Völlig gesund bleiben auch Generationen hindurch Stecklinge, die von kranken Pflanzen stammen und in denen das Virus gleichfalls enthalten ist. Verf. verglich nun kranke Blätter und solche von gesundeten Pflanzen in bezug auf Virusgehalt und fand, daß die ersteren 5—10 mal mehr Virus enthalten als die letzteren. Es gelang nicht, die Blätter gesundeter Pflanzen durch erneute Beimpfung wieder krank zu machen oder den Virusgehalt in ihnen zu erhöhen. Auch die Wurzeln von gesundeten Pflanzen enthielten beträchtlich weniger Virus als die von kranken, nur in den Stengeln war kein Unterschied nachweisbar. Auf Grund der Ergebnisse ist man entgegen der Kritik berechtigt, im vorliegenden Fall von einer erworbenen Immunität zu sprechen. E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Stanley, W. M., Chemical studies on the virus of tobacco mosaic. VI. The isolation from diseased Turkish tobacco plants of a crystalline protein possessing the properties of tobaccomosaic virus. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 305.)

Verf. konnte aus Tabakpflanzen, die mit dem gewöhnlichen Tabakmosaikvirus infiziert waren, ein Protein in Kristallform gewinnen, das die Eigenschaften dieses Virus aufweist. Die Methode wird ausführlich beschrieben. Die Kristalle haben die Form von etwa 0,02 mm großen Nadeln. Die Substanz erwies sich als hochinfektiös, ihre Infektionskraft betrug das 100 und 1000fache des gewöhnlichen Infektionssaftes. Sie behielt ihre Aktivität auch nach 10maligem Umkristallisieren ungeschwächt. Sie stellt entweder ein reines Protein oder allenfalls eine feste Lösung verschiedener Proteine vor, jedenfalls ist das Virus ein Protein und kein Lebewesen. Auch das Ergebnis der mitgeteilten Praecipitationsversuche spricht eindeutig dafür, daß das Virus mit dem aufgefundenen Protein identisch ist. — Verf. stellt sich vor, daß das Virus im Pflanzenkörper sich durch Autokatalyse aus einer Substanz bildet, die er als „Praekursor“ bezeichnet und die nur in den für das Tabakmosaik empfänglichen Rassen und Arten vorhanden ist, den dafür immunen aber fehlt. E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Richter, H., Die Gelbsucht der Sommerastern. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzd. Bd. 16. 1936. S. 66—67, 3 Abb.)

Die Gelbsucht (infektiöse Chlorose, Aster Yellows) an Sommerastern (Callistephus chinensis), die bisher nur aus Nordamerika und Japan bekannt war, ist neuerdings in Ungarn und im Jahre 1935 auch in Deutschland (Berlin) aufgetreten. Die einzige Möglichkeit, die Ausbreitung der Krankheit zu verhindern, ist die rechtzeitige Vernichtung erkrankter Pflanzen. Die ersten Symptome der Krankheit äußern sich in gelblichen Aufhellungen längs der Blattnerven. Die Blätter kranker Pflanzen stehen meist steil aufgerichtet. Später wird das chlorotische Aussehen der Blätter ausgeprägter, Mosaikfleckung tritt aber nicht auf. Befallene Pflanzen bleiben im Wachstum zurück. Der Wuchs ist gestaucht. Der anormale Wuchs macht sich auch an den Blütenköpfen bemerkbar, deren Strahlenblüten verkürzt und mehr oder weniger stark ergrünt sind. Meist werden in starkem Maße schwächliche Seitenzweige gebildet, die gelb, oft fast weiß sind. Vielfach sind nicht die ganzen Pflanzen befallen, sondern nur Teile. Nach amerikani-

schen Untersuchungen erfolgt die Übertragung ausschließlich durch Insekten. Bei diesen Versuchen konnte das Virus auf zahlreiche Vertreter von 30 Pflanzenfamilien übertragen werden.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Tierische Schädlinge.

Zolk, K., Über den Einfluß der Saatzeit auf den Befall von Fritfliege (Oscinella frit L.). (Mitt. Versuchsstat. ang. Ent. Univ. Tartu. Nr. 36. 1936. 7 p. [Estn. mit deutsch. Zusfassg.]

Nachdem im Jahre 1934 die Wintersaaten in Estland stark unter der Fritfliege gelitten hatten, befürchtete man das gleiche für 1935 und sammelte durch tägliche Einheitsfänge Daten über das Auftreten der Fliegen. Im N. O. des Gebietes sank am 30. August die Anzahl der Fliegen soweit, daß mit der Roggenaussaat begonnen werden konnte, in anderen Teilen des Landes erst am 3. bzw. 10. September. Es zeigte sich später, daß der vor jenen Zeitpunkten ausgesäte Roggen nicht selten zu 40—100% befallen war, der nachher ausgesäte dagegen sehr wenig gelitten hatte.

K. Friederichs.

Frickhinger, H. W., Kornkäfer und Queckeneule. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 34. 1936. S. 360—361.)

Die durch die Queckeneule (Hadena basilinea) verursachten Kornbeschädigungen werden häufig mit den durch den Kornkäfer (Calandra granaria) hervorgerufenen Schäden verwechselt. Die Schäden durch die Queckeneule werden auf dem Felde verursacht: die Raupen bohren die Körner des Getreides an, die dann von außen her ausgefressene unregelmäßige Aushöhlungen aufweisen, aus denen die weiße Farbe des Mehles heraussieht. Im Gegensatz dazu macht der Kornkäfer seine ganze Larvenentwicklung im Innern des Getreidekornes durch, und erst der vollentwickelte Käfer bohrt sich ein kreisrundes Loch zum Verlassen des ausgehöhlten Kornes. Mit Ausnahme dieses Loches ist also das vom Kornkäfer befallene Korn unbeschädigt. Die Färbung des restlichen Mehlkörpers ist durch die Ausscheidungen der Larve bräunlich gefärbt.

Queckeneulenschaden an eingelagertem Getreide erfordert im allgemeinen keine Sicherungsmaßnahmen, die bekanntlich gegenüber dem Kornkäfer unerläßlich sind.

Heuß (Berlin).

Ruffo, S., Sul brachitterismo nella specie Gryllotalpa gryllotalpa L. (Atti dell' Acad. Agricolt. Sci. et Lett. Verona, Ser. 5. Vol. 13. 1935. p. 145—151.)

Verf. bestätigt auf Grund von Beobachtungen in Italien, daß es eine kurzflüglige und eine langflüglige Form von Gryllotalpa gryllotalpa L. gibt. Die erstere kann nur kurze Flüge in geringer Höhe von der Erde ausführen. Keine Übergänge und Zwischenformen.

K. Friederichs.

Klee, H., Zur Kenntnis der Weizengallmücken Contarinia tritici Kirby und Sitodiplosis mosellana Géhin (aurantiaca Wagner). Inaug.-Diss. Kiel 1936.

Im Weizenanbaugebiet von Ostholstein, besonders auf der Insel Fehmarn, treten die Weizengallmücken Contarinia tritici und Sitodiplosis mosellana häufig schädigend auf. Verf. gibt von beiden Arten eine eingehende Beschreibung der morphologischen und biologischen

Besonderheiten. Als Wirtspflanzen kommen außer Weizen noch Gerste, Roggen, Hafer, Quecke und Ackerfuchsschwanz in Frage. Ei-, Larven- und Puppenparasiten sind verschiedene Proctotrupiden, Chalcididen und Ichneumoniden, doch scheinen sie auf Fehmarn infolge der kühl-feuchten Witterung zu spät zu kommen, um das Gros der Larven erfassen zu können. Das Krankheitsbild ist bei beiden Arten verschieden. Da C. tritici im Beobachtungsgebiet häufiger ist, wurde auch das Schadbild (Taubheit der Ährchen an der Spelzbasis) öfter angetroffen. Bei starkem Befall beträgt der Ernteausfall beim Weizen 20—30%. Die Ursachen hierfür sind im einseitigen Weizenanbau und den hohen Stickstoffgaben zu suchen. Durch Wechsel des Saatgutes oder Änderung der Saatzeit wird der Befall kaum beeinflußt. Intensive Bodenbearbeitung, insbesondere Pflügen im Frühjahr, drückt den Befall, hebt ihn aber nicht auf. Bessere Aussicht auf Erfolg brachten Versuche mit verschiedenen Düngemitteln. Auf Flächen, die mit Kainit (10 dz je ha) behandelt waren, wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn die Gabe unmittelbar nach dem Pflügen gegeben wurde. Auf diese Weise wurden 75—80% der Larven vernichtet.

Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Schultz, H., Über die Eignung verschiedener Solanaceen als Nährpflanzen des Kartoffelkäfers. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. 16. Jahrg. 1936. S. 25—27.)

In einem Sammelreferat über mehrere französische Veröffentlichungen erwähnt Verf. Solanum edinense als eine Wirtspflanze des Kartoffelkäfers, die am stärksten unter dem Kartoffelkäfer zu leiden hat. Sehr gern werden auch S. tuberosum, S. marginatum, S. stramonifolium, S. cornutum, S. dulcamara, S. lycopersicum und andere angenommen. Wenig geeignet als Nährpflanze sind dagegen u. a. S. nigrum und S. demissum. Das Laub dieser Pflanzen wird nur einige Tage befressen; dann gehen die Larven zugrunde. Ähnliche Unterschiede in der Eignung finden sich auch bei Nicotiana und Datura. Die Gründe hierfür liegen einmal in der verschieden starken Behaarung, zum anderen im Chemismus des Blattes. Es besteht hiernach die Möglichkeit, Kartoffelsorten zu züchten, die nicht vom Kartoffelkäfer befressen werden.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Oekologie, biologische und chemische Bekämpfung tierischer Schädlinge.

Herfs, A., Ökologisch-physiologische Studien an Anthrenus fasciatus Hbs. (Zoologica. Bd. 36. Heft 90. 1936. 96 S., 5 Taf.)

Eine ausführliche Studie über einen wichtigen Schädling von Textilien. Hauptsächlich werden Gewebe tierischer Herkunft angegriffen, wie der Käfer im Freien Kadaverfresser oder Nestbewohner ist. Insbesondere ist er Hornfresser. Die Untersuchungen betreffen ferner die Nahrungsmenge, die Reaktionen gegenüber der Temperatur, der Feuchtigkeit und dem Licht, auch den Einfluß dieser Faktoren auf die Anzahl der Häutungen. Die Imagines sind auch Blütenbesucher und fressen Pollen und Honig. Die Art ist in Europa bisher nur im Süden gefunden worden und hauptsächlich in Nordafrika, Kleinasien und Indien schädlich. Der Wert der Arbeit liegt vor allem in den genauen physiologischen Feststellungen.

K. Friederichs.

Tomaszewski, W. und Fischer, W., Versuche mit Obstbaumkarbolineen und Baumspritzmitteln. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 16. 1936. S. 73—76, 87—89.)

In der vorliegenden Veröffentlichung wird die Frage untersucht, welchen Einfluß die chemisch-physikalische Beschaffenheit der Teeröle auf Insekteneier und -imagines ausübt. Die Obstbaumkarbolineen wurden nach zwei, die Baumspritzmittel nach drei verschiedenen Methoden analysiert. Zur Prüfung der oviziden Wirkung wurden Eier vom Seidenspinner, Frostspanner und Apfelblattsauger, zur Prüfung der insektiziden Wirkung Anthonomus pomorum benutzt. Dabei gehörten die ovizid wirksamsten Mittel hauptsächlich Präparaten mit hohem Gehalt an Schwerölen an. Eine an sich geringere ovizide Wirkung infolge Mangels an hochsiedenden Ölen kann z. T. durch einen übermäßig hohen Phenolgehalt ausgeglichen werden; doch wird man mit Rücksicht auf die Pflanzen nicht den Phenolgehalt, sondern den Schwerölanteil steigern. Ohne merklichen Einfluß auf die Wirksamkeit scheint ein teilweiser Ersatz der Steinkohlenteeröle durch solche aus Braunkohlen zu sein. Teeröle mit hohem Anteil von unter 200° siedenden Ölen senken die ovizide Wirkung stark. Der günstige Einfluß hochsiedender Bestandteile kommt auch bei den Baumspritzmitteln zum Ausdruck. Sie zeigten in ihrer oviziden und insektiziden Wirkung eine deutliche Überlegenheit über Obstbaumkarbolineen. Ein Zusatz von Kupferkalkbrühe zeigte nur in einem Falle einen deutlich nachteiligen Einfluß. Mineralöl-Emulsionen wirkten teilweise wesentlich stärker ovizid als Teeröl-Emulsionen. Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Hampp, H., Erdflohbekämpfungsversuche bei Hopfen auf dem Hopfenversuchsgut Hüll 1935. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 34. 1936. S. 269.)

Geprüft wurden in sechs Versuchen 21 verschiedene Präparate, deren Wirksamkeit nach 6, 24, 48 und 72 Std. beobachtet wurde. Wie früher zeichneten sich die Derrispräparate auch diesmal wieder durch schnelle und sicher tötende Wirkung aus. Kontra-Halticinca ist dem Kontra-Insektenwürger gleich, erfordert aber wegen des geringeren Giftgehalts die vierfache, bedeutend teurere Menge. Nikotinstäubepräparate hatten nur eine mittelmäßige Wirkung, die bei Parasitol und Sinaphit durch hohen Verbrauch bis gut gesteigert werden konnte. Mit zwei Pyrethrumpräparaten war selbst bei hohem Verbrauch nur ein mäßiger Erfolg zu verzeichnen. Arsenpräparate wirkten langsam und meist nur mittelmäßig. Gut war ihre Wirkung nur bei länger anhaltender guter Witterung. Das Präparat Naaki (aktive Kieselsäure) wirkte meist nur mäßig. Heuß (Berlin).

Zattler, F., Die Hopfenblattlaus und ihre Bekämpfung. (Allgem. Brauer- u. Hopfenztg. Bd. 76. 1936. S. 467—468.)

Der Hopfen wird von der Blattlausart Phorodon pruni Scop. (Ph. humuli Schrk.) heimgesucht, die zu den sog. wirtswechselnden Läusen gehört. Im Frühjahr werden die zur Überwinterung dienenden Wirtspflanzen — Schlehensträucher, Zwetschgen- und Pfirsichbäume und andere Prunus-Arten — verlassen. Aus den überwinterten Eiern entstehen zunächst die ungeflügelten Stammütter, die ohne Befruchtung geflügelte Weibchen — die sog. Aphis-Fliegen — hervorbringen, die auf den Hopfen überfliegen und ungeflügelte Nachkommen gebären, die sich ungeschlechtlich sehr rasch

vermehren. Zwischendurch können auch wieder geflügelte Blattläuse entstehen, die auf noch unbefallene Stöcke fliegen und den Schädling weiter verbreiten.

Die Schädigung der Hopfenpflanze, die eigentlich nur den Zwischenwirt für den Sommer darstellt, besteht in der Verkümmerung der Triebe und Blätter und des Doldenansatzes durch den Saftentzug der saugenden Insekten. Als Folgeerscheinung des Blattlausbefalles kommt es häufig zur sog. Schwärzebildung durch Rußtaupilze, die sich von der süßen, zuckerhaltigen Ausscheidung der Blattläuse ernähren.

Zur Bekämpfung der Blattlausplage ist außer dem Schutz ihrer natürlichen Feinde — Marienkäferchen, Schwirrfliege, Florfliege, Schlupfwespe u. a. Insekten sowie Vögel — sachgemäße Düngung des Hopfens wichtig. Die direkte Bekämpfung durch Spritzmittel ist bei rechtzeitiger Anwendung verhältnismäßig leicht. Im Gegensatz zur Peronospora ist zur Bekämpfung der Blattlaus eine kräftige Bespritzung notwendig. Als Spritzmittel haben sich bewährt: Schmierseifenlösung, deren Wirkung durch Zugabe von Tabakextrakt, Petroleum oder Quassia-Extrakt erhöht werden kann, Chlorbarium- oder Chlorbarium-Schmierseifenlösung und eine Reihe von Industriemitteln, besonders Pyrethrum- und Derrisspritzmittel. Diese leisten besonders dann gute Dienste, wenn nach der Ausdoldung noch gespritzt werden muß, weil die anderen Mittel für die Dolden schädlich sind. Heuß (Berlin).

Miles, H. W., and Cohen, M., The Chrysanthemum Leaf Miner and its Control. (Journ. of Ministry of Agric. Vol. 43. 1936. p. 256—261, 3 figs.)

Die blattminierende Fliege Phytomyza atricornis Mg. richtet in England Jahr für Jahr in Chrysanthemum- und Cinerariakulturen großen Schaden an. Die Beschädigungen können deshalb einen so großen Umfang annehmen, weil die Tiere bei einer Eizahl von 50—100 pro Weibchen nur etwa 26 Tage zur Entwicklung von der Eiablage bis zur Imago brauchen und bei geeigneter Witterung bis zu 6 Generationen in einem Jahr auftreten können. Zwei Larven reichen bereits aus, um ein Blatt vollständig zu vernichten. Bei starkem Befall sind sämtliche Blätter vergilbt und nur der Stengel allein bleibt grün. Parasitierung, namentlich durch Braconiden, kommt recht häufig vor und erreichte in einem Fall 98%. Als Minderung des Befalls kann sich dies aber erst in der nächsten Fliegengeneration auswirken, da alle parasitierten Larven das Puppenstadium erreichen und in ihrer Fraßtätigkeit nicht behindert sind. Es ist daher immer eine Bekämpfung mit chemischen Mitteln erforderlich, um die bereits befallenen Pflanzen zu retten. Bei Laboratoriumsversuchen wurden gute Erfolge mit Nikotinseifenlösung (0,05% Reinnikotin und 0,4% Seife) erzielt, Eier, junge Larven und Imagines wurden damit vollständig abgetötet. Da aber die Puppen unbeschädigt blieben, mußte die Behandlung mehrfach in Abständen von etwa 10 Tagen wiederholt werden. Dieses Verfahren erwies sich als wirksam zur Verminderung der Beschädigung und zur gänzlichen Ausrottung der Fliegen. Im Freiland wurden auf großen Flächen Versuche angestellt mit Naphthalin-Kieselsäure-, Schwefel- und Nikotinstaub und Nikotinspritzmitteln. Die besten Ergebnisse lieferte die Spritzung mit Nikotin (0,033% Reinnikotin), abschreckend und abtötend wirkte Nikotinstaub. Schwefelstaub war wenig wirksam, wirkungslos Naphthalin-Kieselsäurestaub. Für die praktische Bekämpfung werden folgende Anweisungen gegeben: Wieder-

holtes Spritzen mit Nikotin in 10 Tagen Abstand oder, wo dies nicht möglich ist, Stäuben mit Nikotin oder Schwefel in den gleichen Zeitabständen zur Verminderung des Befalls. Am geringsten sind die Schädigungen, wenn man die Ableger vor dem Einpflanzen in verdünnte Nikotinlösung taucht und sie weiterhin alle 10 Tage mit Nikotin spritzt. So behandelte Pflanzen zeigen keine Blattbeschädigungen durch Minierer, Capsiden oder Aphiden.

S y (Berlin-Dahlem).

Egermann, E., Die Bekämpfung des Liebstöckel-Lappenrüßlers (Otiorrhynchus ligustici). (Dtsch. Landw. Presse. 63. Jahrg. 1936. S. 210.)

Zur Bekämpfung wird die Anlage von Fanggräben empfohlen, die täglich auf Käfer untersucht werden müssen. Die Vernichtung erfolgt mit einem zu diesem Zweck besonders hergerichteten Flammenwerfer. Durch Auslegen von Blättern der Traubenkirsche oder anderer Laubpflanzen, außer Weide und Birke, können die Käfer auch angelockt und auf die genannte Weise abgetötet werden. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Hamacher, Neuzeitliche Kohlfliegenbekämpfung im Feldgemüsebau. (Dtsch. Landwirtsch. Presse. 63. Jahrg. 1936. S. 221.)

Von den benutzten Mitteln hatten sich Sublimat und, mit Abstand, Obstbaumkarbolineum bewährt. Die besten Erfolge wurden bei zweimaliger Behandlung am 3. oder 4. und am 14. oder 15. Tag nach dem Pflanzen erzielt. Zum Schutz der Anzuchtbeete wird Naphthalin oder eine 1—2 proz. Nitrophoskalösung empfohlen. Die Kosten der Kohlfliegenbekämpfung mit Sublimat, die im großen mit einer Karrenspritze von 300 l Fassungsvermögen durchgeführt wurden, betragen bei zweimaliger Behandlung je Hektar etwa 40 RM. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Mahner, A., Über Auftreten und Bekämpfung von Getreideschmalkäfern. (Dtsch. Landw. Presse. 63. Jahrg. 1936. S. 221—222 u. 232.)

Der Getreideschmalkäfer oder -plattkäfer, Oryzaephilus (Silvanus) surinamensis (L.) Ganglb., wurde in die Gemeinde T. in Nordböhmen wahrscheinlich mit Sojaschrot eingeschleppt und konnte sich derart massenhaft vermehren, daß die Bewohner ihre Wohnungen räumen mußten. Bekämpfungsmittel, wie Ausschwefeln, Verstäuben von Formalin und Ausstreuen von Chlorkalk, blieben ohne Erfolg. Infolge der später einsetzenden winterlichen Jahreszeit nahm das Massenauftreten wieder ab. Der Aufsatz enthält eine kurze Zusammenstellung der bisher aus dem Schrifttum bekannt gewordenen Angaben über Lebensweise und Bekämpfung des Schädlings. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Speyer, W., Die Empfindlichkeit von Insekten und Insektenlarven gegen Teerölpräparate. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 16. 1936. S. 89—92.)

Zur Anwendung kamen Mittelöl- und Schweröl-Obstbaumkarbolineen, ferner ein mischbares Teeröl-Baumspritzmittel und ein gleiches Präparat mit Zusatz von „Kupferkalk Wacker". Hochgradig empfindlich waren die Spinnen. Auch Phyllotreta- und Dromius-Arten gehören zu den empfindlichen Insekten. Anthonomus war ziemlich widerstandsfähig,

ebenso Laria, ohne jedoch die Teerölfestigkeit von Coccinella zu erreichen. Eine große Widerstandsfähigkeit besitzen die weichhäutigen Obstmaden. Verf. konnte feststellen, daß diejenigen Insekten, die die stärksten und umfangreichsten Sicherungen in den Zugängen zu ihrem Tracheensystem haben, auch am widerstandsfähigsten gegen Teerölpräparate waren. Von den benutzten Präparaten hatte mischbares Teeröl-Baumspritzmittel die größte insektizide Wirkung. Ein Zusatz von „Kupferkalk Wacker" veränderte die Wirksamkeit nur ganz unwesentlich.

Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Goffart, H., Fortschritte in der Bekämpfung der Kartoffelnematoden (Heterodera schachtii Schm.). (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. 16. Jahrg. 1936. S. 38—40 u. 51—52.)

Als brauchbares Verfahren zur Bekämpfung des Kartoffelnematoden hat sich die Durchführung eines Fruchtwechsels erwiesen. Der Grad der Bodenverseuchung sinkt hierbei zunächst beträchtlich, in den folgenden Jahren jedoch langsamer, so daß noch nach 10 Jahren mit einem Besatz von Nematoden im Boden gerechnet werden muß. Gleichzeitig setzt aber auch eine Steigerung der Kartoffelerträge ein. Da nun nach einem einmaligen Kartoffelanbau die Bodenverseuchung so stark ansteigt, daß die nachfolgende Kartoffelernte gefährdet wird, empfiehlt sich die Einrichtung einer Dreifelderwirtschaft. Die Prüfung von Kartoffelsorten auf ihr Verhalten gegenüber dem Schädling zeigte, daß es nichtanfällige Sorten nicht gibt, doch sind manche Sorten widerstandsfähiger als andere. Nachbau von verseuchtem Boden geernteten Pflanzgutes auf Nematodenböden ist zu vermeiden. Überdüngung und unmittelbare Bekämpfung der Kartoffelnematoden mit chemischen Mitteln haben gewisse Teilerfolge gezeitigt, die aber vorläufig nur die Bedeutung einer zusätzlichen Bekämpfung haben.

Autorreferat.

Steiner, G., Opuscula miscellanea nematologica I. (Proc. Helm. Soc. Washington. Vol. 2. 1935. p. 41—45.)

Unter dieser Überschrift veröffentlicht der Verf. eine Reihe von Beobachtungen an verschiedenen Nematoden. In der ersten Mitteilung werden vier neue Arten besprochen. Die erste, Anguillulina gallica n. sp., wurde gemeinsam mit einem Pilz im Holz einer Ulme aus Frankreich gefunden. Der Nematode hat eine große Ähnlichkeit mit der am Ulmensplintkäfer, Ips typographus, lebenden Anguillulina major Fuchs. Acrobeles glaphyrus n. sp. wurde in einer geschädigten Knolle von Polyanthes tuberosa gefunden. Von Cephalobus maximus Thorne, der bisher nur im weiblichen Geschlecht bekannt war, ist nun auch das Männchen in einer Knolle von Iris xiphioides festgestellt worden. Schließlich wird noch die Synonymie von Anguillulina costata (de Man) Goodey und A. cancellata (Cobb) Goodey nachgewiesen.

Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Steiner, G., Opuscula miscellanea nematologica II. (Proc. Helm. Soc. Washington. Vol. 2. 1935. p. 104—110.)

In der vorliegenden Mitteilung wird u. a. über zwei neue aus Kuba stammende an Kartoffeln gefundene Nematoden, Aphelenchoides solani und Cephalobus cubaensis, berichtet. Aus Japan stammende erkrankte Knollen von Lilium tigrinum und Früchte

von Physalis ixocarpa enthielten in größerer Menge einen noch unbekannten Nematoden, der Aphelenchoides hunti benannt wurde. Aus Sternbergia lutea wurden Neocephalobus compsus n. sp., Panagrolaimus heterocheilus n. sp. und Cephalobus symmetricus erhalten, die vermutlich nur als sekundär auftretende Schädlinge anzusehen sind.

Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Steiner, G., Opuscula miscellanea nematologica III. (Proc. Helm. Soc. Washington. Vol. 3. 1936. p. 16—22.)

An eingesandten kranken Erdbeerpflanzen wurden außer Befall durch den Pilz Cylindrocarpon sp. in großer Menge zwei Nematodenarten festgestellt, und zwar Rhabditis spiculigera n. sp., der wahrscheinliche Überträger der Krankheit, und Neocephalobus elongatus (de Man) n. comb., ein vermutlich fakultativ auftretender Parasit. Als Neocephalobus leucocephalus n. sp. wurde ein aus einer Kultur von Ceratostomella erhaltener Nematode beschrieben. Schließlich berichtet Verf. über zwei neue Nematoden aus Iris ochroleuca, die mit den Namen Rhabditolaimus prodelphis n. sp. und Eucephalobus nannus n. g., n. sp. belegt werden.

Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Tierkrankheiten. Tierparasiten.

Hartzell, A., Histopathology of nerve lesions of Cicada after paralysis by the Killer-wasp. (Contrib. Boyce Thompson Instit. Vol. 7. 1935. p. 421—425, 1 fig.)

Untersuchung des Zentralnervensystems von Zikaden (Tibicen pruinosa), die durch den Stich der Raubwespe Sphecius speciosus gelähmt waren, ergab nach Färbung mit 0,12 wässerigem Toluidinblau, daß das Bild der Schädigung durch den Stich ein ähnliches ist wie bei Insekten, die mit Triorthocresyl-Phosphat oder mit Pyrethrin getötet sind. Versuche, ähnliche paralytische Schädigungen bei Mehlwürmern durch Injektion von Ameisensäure oder Essigsäure hervorzurufen, schlugen fehl.

K. Friederichs.

Paul, Dora, Beobachtungen über die Darmparasiten schlesischer Anuren. (Ztschr. f. Parasitenkde. Bd. 7. 1935. S. 172—197.)

Der Befall durch Nematoden war bei Rana arvalis größer als bei Rana temporaria, geringer als bei diesen Arten bei Rana esculenta, der andrerseits stark von Trematoden und Ciliaten befallen wird. Dies hängt mit der Lebensweise zusammen. R. esculenta, dauernd in oder neben dem Wasser lebend, erhält jene Parasiten beim Fressen der Wassertiere, die ihnen als Zwischenwirte dienen. Nematoden dagegen gelangen besonders in die anderen, nicht so an das Wasser gebundenen Froscharten, weil die Nematodenlarven in feuchter Erde leben. Die Feuerkröte wird nur von Protozoen in beträchtlicher Menge parasitiert, der Laubfrosch ist fast frei von Parasiten.

Kaulquappen der Frösche enthielten nur Flagellaten und Ciliaten; später kommen bei jungen Fröschen die Nematoden und schließlich die Trematoden hinzu.

K. Friederichs.

Abgeschlossen am 11. November 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 95. No. 18/20.
Ausgegeben am 11. Januar 1937.

Nachdruck verboten.

Neue badische Reinhefen.

[Mitteilung Nr. 287 des Badischen Weinbauinstitutes, Freiburg i. B.]

Von **J. G. Zimmermann.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

Nach den bisherigen Erfahrungen gilt es als zweckdienlich, wenn die Traubenmoste mit einer Reinhefe vergoren werden, die aus dem gleichen Anbaugebiet stammt, damit der gebietseigene Charakter der Weine nicht gestört wird. Bei der Übernahme der Hefereinzuchtabteilung von der Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Augustenberg erhielt das Badische Weinbauinstitut in Freiburg sieben Heferassen, unter denen sich nur eine einzige badische Reinhefe aus einem Affentaler Rotwein befand. Es war daher dringend geboten, die Züchtung einheimischer Heferassen in Angriff zu nehmen, zumal die vorwiegend an die Praxis abgegebene Rasse „Steinberg von 1893"[1]) nicht mehr voll und ganz den an eine Reinhefe zu stellenden Anforderungen entsprach und die „Affentaler" nicht gärkräftig genug ist.

Als Ausgangsmaterial wurde Hefetrub aus 1934er Weinen verwendet, der uns von einigen Weingutsbesitzern zur Verfügung gestellt wurde.

Unsere Bezeichnung	Traubensorte und Herkunft	
A	Riesling 106° Ö. Ihringer Winklerberg	Kaiserstuhl
B	Rulander 106° Ö. Achkarrener Schloßberg	
C	Silvaner 99° Ö. Achkarrener Schloßberg	
D	Gutedel. Batzenberg, Markgräflerland	

Mittels der Lindnerschen Tröpfchenmethode wurde eine große Anzahl Stämme isoliert. Davon gelangten zur Vorprüfung von A 11, von B 11, von C 13, von D 10 Stämme (zusammen 45). Für die Vorprüfung wurden 400 ccm Most in Rollflaschen mit 450 ccm Inhalt (Watteverschluß) mit einer Platinöse einer Agarkultur geimpft und folgende Eigenschaften beobachtet: Beginn der Gärung (= Schaumbildung), Stärke der Schaumbildung, Trübung der Flüssigkeit, Absetzen der Hefe, Masken- und Ringbildung, Hautbildung und Temperaturempfindlichkeit (jeweils eine Kultur bei 7° C

[1]) Die von Augustenberg erhaltene Rasse Steinberg zeigt im besonderen unzuverlässigen Garbeginn und zum Teil schleppende Gärung, sowie mangelndes Umgarungsvermögen. Beim Vergleich mit einer für diesen Zweck von Geisenheim bezogenen Originalkultur der Rasse Steinberg von 1893 verhielt sich der hiesige Stamm gärkräftiger als der Geisenheimer. Dieses Verhalten ist wohl als Degenerationserscheinung zu deuten, die ihre Ursache in einer über 40jährigen Kultur in Most und Rohrzuckerlösung sowie auf Agar-Agar hat.

und eine bei 16—18° C). Als Vergleich dienten die bereits vorhandenen Rassen, im besonderen die Rassen Steinberg 1893, Winningen und Schloß Wädenswil. Auf Grund der Vorprüfung wurden 10 Stämme wegen schlechten Absetzens, Masken- und Ringbildung (letztere zeigt unsere Steinberg in starkem Maße) und schlechter Gärung ausgeschieden.

Die bei 16—18° gehaltenen Kulturen wurden nach zwei Monaten auf Alkohol, Extrakt, Gesamtsäure und flüchtige Säure untersucht. Die Ergebnisse sind in Übersicht I zusammengestellt.

Übersicht I.

Herkunft	Zahl der Stämme	Alkohol, Gehalt g/l		Extrakt, Gehalt g/l		Gesamtsäure g/l		Flüchtige Säure[2]) g/l	
		M	σ[1])	M	σ[1])	M	σ[1])	M	σ[1])
A	9	60,5	± 2,4	24,3	± 1,3	8,7	± 0,3	0,43	± 0,18
B	11	60,2	± 2,3	25,8	± 1,8	9,3	± 0,5	0,74	± 0,11
C	6	59,6	± 1,2	23,9	± 1,1	8,9	± 0,3	0,61	± 0,06
D	9	59,3	± 2,1	24,3	± 1,1	8,9	± 0,3	0,58	± 0,08

[1]) σ = durchschnittliche Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert (Standardabweichung).

[2]) Als Essigsäure berechnet.

Die Mittelwerte (M) des Alkoholgehaltes unterscheiden sich bei den vier Herkünften nur unbedeutend. Hinsichtlich des Extraktgehaltes weisen die B-Stämme den höchsten Wert auf. Die Unterschiede im Gehalt an flüchtiger Säure sind bemerkenswert. Die Herkunft A hat den niedrigsten Mittelwert für flüchtige Säure, aber auch den größten Wert für σ. Es finden sich darunter Stämme, die sehr wenig und solche, die etwa mittelmäßig viel flüchtige Säure bilden. Die B-Stämme bilden hingegen im allgemeinen große Mengen derselben. Zwischen B und C, die beide gleicher Herkunft sind, bestehen Unterschiede im Extrakt- und Säuregehalt. Die Klärung der Frage, ob Bodenart und Lage Einfluß auf die Eigenschaften der Hefen haben, und ob die Traubensorten eine gewisse Selektion unter den Hefestämmen bewirken, soll einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben. Es soll hier nur darauf hingewiesen werden, daß solche Beziehungen und Einflüsse zu bestehen scheinen.

Auf Grund der Vorprüfung wurden noch 14 Stämme weiter geprüft und folgende Eigenschaften festgestellt:

1. Gärbeginn (= Beginn der Schaumbildung). Als Maßstab gilt der Zeitpunkt, an dem 0,10 g CO_2 aus 50 ccm Most entwichen sind.

2. Gärungsenergie. Diese findet ihren Ausdruck in der nach 3 Tagen gebildeten Menge Alkohol.

3. Gärgeschwindigkeit. Für diese ist die nach 7 Tagen gebildete Menge Alkohol der Maßstab.

4. Endvergärungsgrad. Dieser wird durch den Alkoholgehalt nach 4—8 Wochen ausgedrückt[1]).

[1]) Auf die Feststellung der Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefezellen wurde verzichtet, da für die Praxis die angeführten Punkte ausschlaggebend sind. In dem Wert für Gärbeginn und Gärungsenergie ist ja die Vermehrungsgeschwindigkeit praktisch mit eingeschlossen, da nicht mit einer bestimmten Zahl Hefezellen, sondern mit volumetrisch gleichen Mengen einer 5 Tage alten Kultur geimpft wurde.

Zur Bestimmung der Eigenschaften wurden 400 ccm Most im Verhältnis 1 : 500 mit einer 5 Tage alten Kultur geimpft. Verwendet wurden Mostkonzentrationen von 49° (Obstmoste!), 70°, 82° und 102° Öchsle. Außerdem wurden die Stämme auf ihre Eignung für die Umgärung untersucht, da für diesen Prozeß die Verwendung von Reinhefe notwendig ist. Für diesen Versuch wurde ein sterilisierter Wein verwendet, mit 64,5 g/l Alkohol, 1,38 g/l flüchtiger Säure (als Essigsäure berechnet) und 5,76 mg/l freier schwefliger Säure. Nach dem Zuckerzusatz betrug der Extraktgehalt 78,6 g/l. Die Empfindlichkeit gegen schweflige Säure wurde in einem mit 20 g/l Kaliumpyrosulfit geschwefelten Moste festgestellt (auf Grund der CO_2 Abgabe aus 50 ccm Most), sowie durch Bestimmung der Gärungsenergie, der Gärgeschwindigkeit und des Endvergärungsgrades.

Die Eignung für die Vergärung von Rotweinmaischen wurde unter den gleichen Bedingungen, wie oben angeführt, geprüft, nur wurde dem Most noch 1,5 g/l Tannin zugesetzt. Die Wirkung des Rotweinfarbstoffes auf den Gärverlauf mußte allerdings außer acht gelassen werden.

Natürlich wurde auch die Vergärung durch die Stämme bei verschiedenen Temperaturen geprüft.

Auf Grund dieser Untersuchungen konnten 5 Stämme als besonders brauchbar ausgewählt werden, deren wichtigste Eigenschaften im Vergleich mit den Rassen Steinberg und Winningen in Übersicht II aufgeführt sind. Auf Grund der morphologischen und physiologischen Untersuchungen gehören die neuen Stämme zu S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e v a r. e l l i p s o i d e u s (Hansen) Dekker.

Übersicht II.
Alkoholgehalt in g/l nach Tagen; fluchtige Saure in g/l nach vollstandiger Vergärung.

	Mostkonzentration								Um-garung		Fl. Sr.	Gar-beginn bei 6,5° C	Schwefelung CO_2-Abgabe[1]	
	102° Öchsl.		82° Ö.		74° Ö.		49° Ö.							
	nach 3 Tagen	nach 57 Tagen	nach 3 Tagen	nach 50 Tagen	nach 3 Tagen	nach 29 Tagen	nach 3 Tagen	nach 22 Tagen	nach 4 Tagen	nach 29 Tagen	67° Ö.	nach Tagen	unge-schw. nach 6 Tagen	ge-schw. nach 7 Tagen
A 29	18,4	102,8	17,8	79,1	28,7	77,7	15,8	50,9	10,9	26,5	0,57	9	65	65
A 40	22,9	98,6	20,0	84,3	35,5	76,9	13,7	49,4	8,5	22,2	0,40	8	62	66
A 41	17,5	98,2	22,2	82,9	19,5	76,9	14,0	51,5	5,1	22,2	0,22	5	70	54
B 27	11,5	106,0	22,8	81,2	28,8	73,7	17,1	52,2	8,5	24,8	0,48	9	63	65
D 38	15,5	105,1	20,2	79,5	22,0	75,7	15,1	51,0	5,8	24,2	0,53	9	58	61
Steinberg	17,7	104,7	18,0	79,4	22,2	76,3	9,9	48,7	4,3	22,8	0,59	10	60	60
Winningen	18,2	99,3	31,9	80,9	34,4	77,7	15,3	50,2	9,1	21,6	0,22	13	51	50

[1]) Aus 1000 ccm Most.

Beurteilung der Hefestämme:

1. S t e i n b e r g (Freiburger Stamm): Gärbeginn spät und zögernd, Gärungsenergie mittelmäßig (vgl. Übersicht VI), Gärgeschwindigkeit mittelmäßig und Endvergärungsgrad gut; Umgärung schlecht.

2. W i n n i n g e n: Gärbeginn, Gärungsenergie und Endvergärungsgrad gut; sehr lange Nachgärung.

3. A 29: Gärbeginn sehr gut, Gärungsenergie und -geschwindigkeit gut. Endvergärungsgrad sehr gut. Für alle Arten von Mosten geeignet, besonders gut für die Umgärung. Kälte- und Wärmeverträglichkeit sehr gut. Für alle Zwecke geeignet.

4. A 40: Sehr schneller Gärbeginn. Große Verträglichkeit gegen Schwefelung. Sulfithefe.

5. A 41: Gärungsenergie bei 18° C und höheren Temperaturen sowie Schwefelverträglichkeit geringer als bei den anderen Stämmen. Endvergärungsgrad gut. Außerordentlich gute Vergärung bei niederen Temperaturen (7°). Bildet nur sehr geringe Mengen flüchtiger Säure, Schaumbildung fast ganz fehlend. Ausgesprochene Kaltgärhefe.

6. B 27: Schneller Gärbeginn, sehr gute Gärungsenergie und -geschwindigkeit. Endvergärungsgrad gut. Für Moste aller Art und Umgärung geeignet.

7. D 38: Guter Endvergärungsgrad und für alle Moste geeignet. Kälteempfindlich, sehr starke Schaumbildung.

Die Stämme A 29—B 27 wurden kellertechnisch geprüft, wobei sie sich gut bewährten und ein gutes Bukett bildeten.

Eine starke Schweflung (20 g/hl Kaliumpyrosulfit) hat auf die neuen Stämme (außer A 41) praktisch kaum Einfluß, da die Gärung der geschwefelten Moste nach 7 Tagen genau so weit war, wie die der ungeschwefelten nach 6 Tagen.

Gegen einen höheren Gerbstoffgehalt zeigten sich alle Stämme völlig indifferent, auch im Vergleich mit den als spezielle Rotweinhefen geführten Rassen Aßmannshausen, Affentaler und Bordeaux.

Diese neuen Stämme übertreffen in den meisten Eigenschaften die Rasse Steinberg 1893 (Stamm Freiburg) wesentlich. Nur hinsichtlich der gebildeten Glyzerinmenge steht Steinberg an erster Stelle, bildet dafür aber beachtlich mehr flüchtige Säure, besonders bei höheren Mostkonzentrationen.

Übersicht III.

	Glyzeringehalt 67° Ö bei 18° C	Gehalt an flüchtiger Säure	
		bei 75° Ö	bei 110° Ö
A 29	4,36 g/l	0,57 g/l	1,10 g/l
A 40	4,71 „	0,40 „	0,85 „
A 41	4,25 „	0,22 „	0,55 „ (102°)
B 27	4,55 „	0,48 „	1,00 „
D 38	4,21 „	0,53 „	0,80 „
Steinberg	4,94 „	0,59 „	1,64 „

Ab Sommer 1936 stehen den badischen Winzern einheimische Reinhefen zur Verfügung, die nach allen praktischen Gesichtspunkten durchgeprüft und unbedingt zuverlässig sind: Stamm A 29 = Rasse „Ihringer Winklerberg“ zur Vergärung von Mosten, Rotweinmaischen und zum Umgären. A 41 als „Badische Kaltgärhefe“ und A 40 als „Badische Sulfithefe“[1]).

[1]) Interessehalber sei erwähnt, daß 2 Stämme isoliert wurden, die so fest absetzen, daß der Hefetrub kaum aufzuschütteln ist und sich sofort wieder in großen Flocken ballt und zu Boden sinkt. Der Stamm B 32 ist dabei sehr empfindlich gegen Schwefelung (bei 20 g/hl KP gar keine Entwicklung und Gärung), B 35 ist auch sehr schwefelempfindlich und bildet außerdem sehr viel flüchtige Säure.

Besondere Untersuchungsergebnisse.

Die Gärversuche wurden durchgeführt mit 250 ccm Most in Rollflaschen mit 450 ccm Inhalt unter Gärverschluß mit Glyzerin. Für jeden Hefestamm und Versuch wurden 3 Flaschen geimpft (1 : 500). Die CO_2-Abgabe wurde gewichtsmäßig bestimmt und an jedem Untersuchungstage eine Flasche der Reihe entnommen. Diesem Verfahren haftet zwar der Fehler an, daß die Flaschen nicht alle gleich weit in der Gärung und die tatsächlichen Mostmengen etwas verschieden sein können. Die Fehler werden aber beträchtlich größer, wenn nur eine Flasche mit großer Mostmenge verwendet und an jedem Untersuchungstage das nötige Quantum entnommen wird. Dann mußte jedesmal die Flüssigkeit durchgeschüttelt werden, um eine Durchschnittsprobe zu erhalten, was wiederum den natürlichen Gärverlauf verändern würde. Vor der Untersuchung wurde die Flüssigkeit durchmischt und von der Hefe abfiltriert.

a) Kaltgärhefe.

Da die Kälteverträglichkeit der Heferassen eine feststehende Eigenschaft ist und sich nicht durch Anpassung erzielen oder wesentlich steigern läßt, ist es wichtig, eine wirkliche Kaltgärhefe zu besitzen. Eine solche Hefe soll

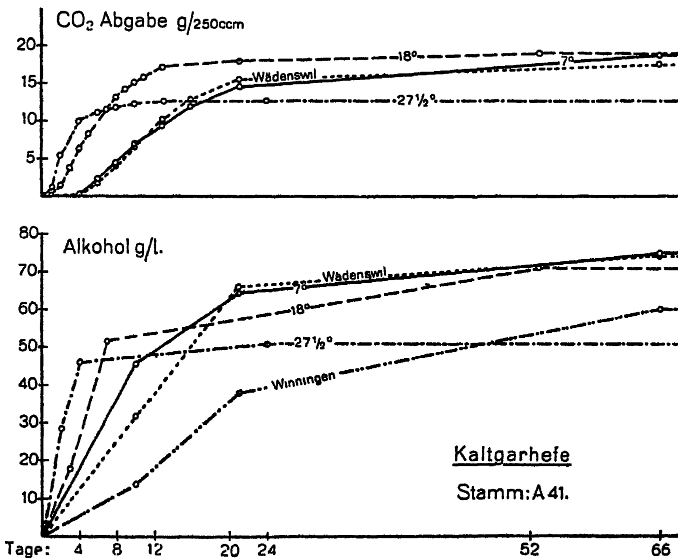


Abb. 1.

den Most bei niederen Temperaturen nicht nur vollständig vergären, das vollbringen auch kälteempfindlichere Hefen, wenn sie nur in genügender Menge zugesetzt werden, sondern sie muß sich auch rasch vermehren.

Der Stamm A 41 ist eine typische Kaltgärhefe, welche die Rasse Schloß Wädenswil in der Gärungsenergie noch übertrifft. In einem Most von 67° Ö. und bei 7° C hatte A 41 nach 10 Tagen bereits 45,8 g/l Alkohol erzeugt, während Wädenswil nur 31,8 g/l aufwies. Nach 21 Tagen hatte sich der Unterschied ausgeglichen und war bei der Schlußuntersuchung geringfügig. Erwähnenswert ist, daß die abgegebene Menge CO_2 trotz des Unterschiedes in der Alkoholmenge während des ganzen Gärverlaufes nahezu gleich war, wie aus der Kurve für Alkoholgehalt und CO_2 Abgabe ersichtlich ist (Abbildung 1). So hatten beide Stämme nach 10 Tagen aus 250 ccm Most 6,7 g CO_2 abgegeben, obwohl A 41 14 g/l Alkohol mehr als Wädenswil gebildet hatte. In der Kultur von A 41 kann also CO_2 in größeren Mengen

als in Kulturen anderer Hefen gehalten werden, was sich vielleicht mit dem geringen Schaumbildungsvermögen von A 41 in Verbindung bringen läßt. (Bei der Beurteilung von Hefestämmen allein auf Grund der CO_2-Abgabe ist also Vorsicht geboten.) Die bisher als Kaltgärhefe bezeichnete Rasse Winningen versagte bei 7° C vollkommen, da sie nur langsam in Gärung kommt und auch nur einen geringen Endvergärungsgrad aufweist.

Die Kälteverträglichkeit von A 41, man kann fast sagen Kältebedürftigkeit, kommt beim Vergleich der bei 7°, 18° [1]) und 27,5° vergorenen Moste sehr deutlich zum Ausdruck (Abb. 1): Bei 7° wird die Gärung zwar erst am 4. Tage bemerkbar, aber die Kurve steigt dann gleich steil an und führt normal weiter bis zu einem hohen Endvergärungsgrad. Bei 27,5° setzt die Gärung bereits am 1. Tage kräftig ein, aber doch merklich schwächer als

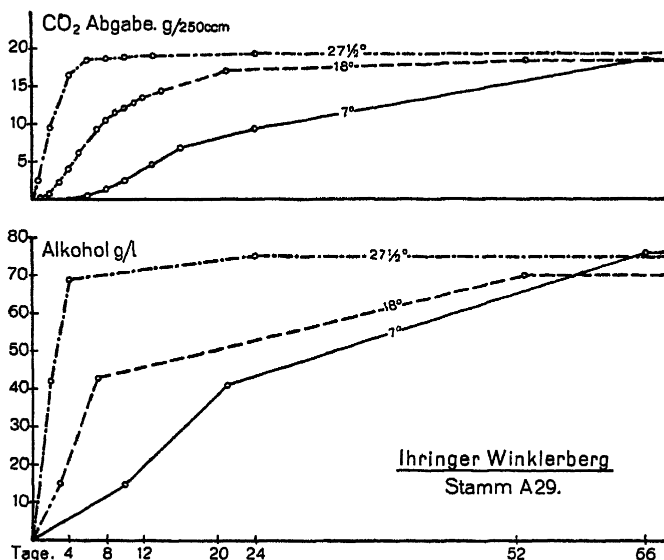


Abb. 2.

bei A 29 und D 38 (Abb. 2 u. 3), und führt nach 4 Tagen zu einem Alkoholgehalt von 46,0 g/l, der bei der Kaltgärung etwa am 10. Tage erreicht wird. Damit bricht die Gärung plötzlich ab und in den folgenden 3 Wochen steigt der Alkoholgehalt nur mehr auf 50,7 g/l. Bei dieser Temperatur war die Hefe also nicht mehr fähig, eine größere Alkoholmenge zu bilden und zu vertragen; es kam zum „Versieden". Die Gärung setzte auch dann nicht wieder ein, als die Kultur bei Zimmertemperatur gehalten wurde. Für die Praxis ergibt sich daraus, daß man Kaltgärhefen nur dann verwenden darf, wenn die Kellertemperatur beachtlich unter der Durchschnittstemperatur liegt, mindestens unter 12° C. Steigt bei der Gärung die Temperatur wesentlich über 20° C, so ist bei Verwendung einer Kaltgärhefe mit einem Versieden zu rechnen. Bei 18° C ist der Gärverlauf normal, wie Abb. 1 erkennen läßt.

Der Stamm A 29 (Abb. 2) kann geradezu als Universalhefe bezeichnet werden, da er sowohl bei niederer wie bei hoher Temperatur einen sehr guten

[1]) Die Endwerte der bei 18° erfolgten Gärung können mit den Endwerten bei 17 und 27,5° nicht ohne Einschränkung verglichen werden, da der bei 18° vergorene Most ein etwas anderes Mostgewicht hatte. An dem Verlauf der Kurven ändert das prinzipiell nichts.

Endvergärungsgrad besitzt. Bei 7° setzt die Gärung zwar 2 Tage später ein als bei A 41, aber die Kurve verläuft gleichmäßig ansteigend bis zum Schluß mit gleichem Endvergärungsgrad wie A 41. Bei 27,5° setzt die Gärung außerordentlich stürmisch ein und ist in 4—6 Tagen im wesentlichen beendet; der Endvergärungsgrad ist gleich dem bei 7°.

Der Stamm D 38 (Abb. 3) ist hingegen kälteempfindlich. Die Gärung setzt bei 7° nach etwa 6 Tagen ein, verläuft dann aber sehr langsam und bleibt nach 66 Tagen in ihrem Vergärungsgrad merklich hinter den beiden anderen Stämmen zurück.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten den von Osterwalder aufgestellten Satz nicht vollständig bestätigen: „Kaltgärhefen erzielen bei kälteren Temperaturen einen höheren Vergärungsgrad, bilden dabei mehr

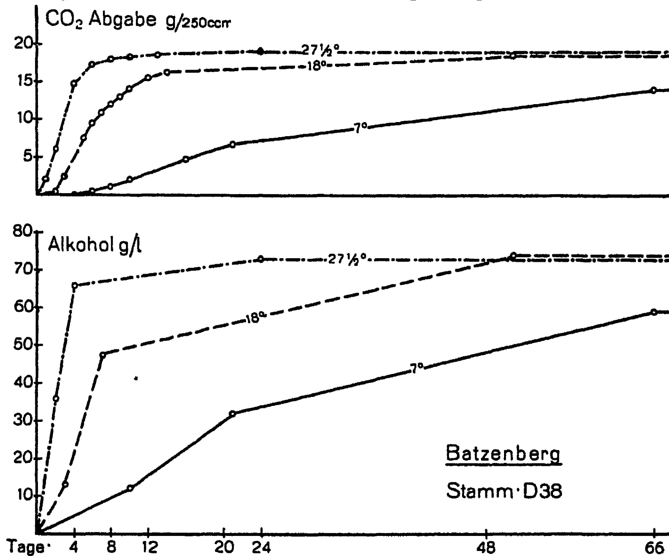


Abb. 3.

Alkohol als gärkräftigere, aber kälteempfindlichere Hefen bei höherer Temperatur.“ Der neue Stamm A 29 ist sehr gärkräftig und merklich kälteempfindlicher als A 41 und Wädenswil. Der Endvergärungsgrad ist aber bei 27,5° ebenso hoch wie bei 7° und gleich dem von A 41 und Wädenswil (74,6 g/l), was aus Übersicht IV klar hervorgeht.

Übersicht IV.
Ergebnis der Enduntersuchung; Vergärung bei 27½° nach 24 Tagen, Vergärung bei 7° nach 66 Tagen.

		Alkoholgeh. g/l	Extraktgeh. g/l	Ges. Säure g/l	Fl. Säure g/l
A 29	27,5°	75,5	25,5	8,8	0,22
	7°	75,9	21,3	7,5	0,28
A 41	27,5°	50,7	61,1	8,7	0,47
	7°	75,4	21,3	7,3	0,16
D 38	27,5°	72,7	23,9	8,3	0,34
	7°	59,1	35,2	8,1	0,40

b) Gehalt an flüchtiger Säure in Beziehung zu Alkoholgehalt, Temperatur und Mostkonzentration.

In der letzten größeren Zusammenfassung über „Die flüchtigen Säuren im Wein“ gibt v. d. Heide an, daß die Menge der flüchtigen Säure mit der Temperatur schwankt und daß bei hohen Zuckerkonzentrationen (unter ungünstigen Verhältnissen) immer weniger Alkohol und immer mehr flüchtige Säuren gebildet werden. Bekannt ist auch, daß jeder Hefestamm eine ihm eigene Menge flüchtiger Säure bildet. Diese Ergebnisse konnten im wesentlichen bestätigt, sie sollen aber hier noch ergänzt und weiter geklärt werden.

1. Flüchtige Säure und Alkoholgehalt.

Je höher der Alkoholgehalt, desto höher der Gehalt an flüchtiger Säure. Verfolgt man während der Gärung dieses Verhältnis, so ergibt sich, daß dieses nicht linear, sondern zu Beginn der Gärung viel großer ist, als gegen das Ende hin. Den Gehalt an flüchtiger Säure = 1 gesetzt, ergibt für Stamm A 29 (Übersicht V) nach 3 Tagen bei 18° C ein Verhältnis fl. Säure : Alkohol wie 1 : 68; nach 7 Tagen ist es fast nur mehr halb so groß 1 : 118 und ändert sich dann bis zur letzten Untersuchung nur wenig 1 : 122. Bei Stamm A 41 ändert es sich entsprechend 1 : 93; 1 : 236; 1 : 322 und bei D 38 1 : 129; 1 : 139; 1 : 208. Das Verhältnis ist bei den einzelnen Stämmen, ihrer Eigenart entsprechend zwar verschieden, aber stets zu Beginn am größten. D. h. am Anfang der Gärung, wenn die Hefen zum Wachstum und zur Sprossung viel Nährstoffe und Energie benötigen, bilden sie mehr flüchtige Säure als gegen das Ende der Gärung, wo das Wachstum im wesentlichen abgeschlossen ist.

Übersicht V.
Verhaltnis von fluchtiger Saure zum Alkoholgehalt.
Fluchtige Saure = 1 gesetzt.

A 29	7° C (nach 10, 21, 66 Tagen)	1 : 93	1 : 193	1 : 270
	18° C (nach 3, 7, 53 Tagen)	1 : 68	1 : 118	1 : 122
	27,5° C (nach 2, 4, 24 Tagen)	1 : 209	1 : 330	1 : 340
A 41	7° C (nach 10, 21, 66 Tagen)	1 : 241	1 : 585	1 : 470
	18° C (nach 3, 7, 53 Tagen)	1 : 93	1 : 236	1 : 322
	27,5° C (nach 2, 4, 24 Tagen)	1 : 82	1 : 109	1 : 108
D 38	7° C (nach 10, 21, 66 Tagen)	1 : 93	1 : 168	1 : 148
	18° C (nach 3, 7, 53 Tagen)	1 : 129	1 : 139	1 : 230
	27,5° C (nach 2, 4, 24 Tagen)	1 : 239	1 : 254	1 : 214

2. Flüchtige Säure und Temperatur.

Die bisherigen Untersuchungen über die Abhängigkeit der flüchtigen Säure von der Temperatur haben noch zu keinen einheitlichen Ergebnissen geführt. Wie aus Übersicht V hervorgeht, ist bei der typischen Kaltgärhefe A 41 das Verhältnis fl. Säure : Alkohol bei 7° C sehr klein. Es beträgt nach 10 Tagen 1 : 241, nach 21 Tagen 1 : 585 und nach 66 Tagen ist es wieder etwas gestiegen auf 1 : 470. (Diese Zunahme ist zur Zeit nicht einwandfrei zu klären.) Bei A 29 und D 38 ist das entsprechende Verhältnis viel größer, da diese bei 7° merklich schlechter vergären als A 41. Bei 27,5° kehrt sich das Verhältnis um: A 41 weist sehr große, A 29 und D 38 hingegen beachtlich kleinere Verhältnisse auf, als bei 7°. A 41 bildet bei einer für diesen Stamm

ungünstigen Temperatur (27,5°) etwa 3 mal soviel flüchtige Säure (Übersicht IV), als bei niederen Temperaturen (7°): dabei war die Vergärung noch nicht vollständig zu Ende geführt. A 29 und D 38 sind kälteempfindlicher und bilden bei niederen Temperaturen etwas mehr flüchtige Säure. Vermutlich wird sich die Annahme, daß Hefen aus südlichen Ländern bei niederen Temperaturen mehr fluchtige Säure bilden, als bei höheren und daß sich Hefen aus den nördlichen Anbauländern umgekehrt verhalten, dahingehend klären lassen, daß die Hefen bei ihrem Temperaturoptimum die geringste Menge flüchtige Säure bilden. Mit der Abweichung vom Optimum wird die Menge ± stark zunehmen.

3. Flüchtige Säure und Mostkonzentration.

Die Zunahme der flüchtigen Säure mit steigender Mostkonzentration ist wesentlich höher als dem höheren Alkoholgehalt entspricht. Das Verhältnis fl. Säure : Alkohol kann zu Beginn der Gärung hoher Moste erstaunlich große Werte annehmen, wie aus Übersicht VI hervorgeht. So zeigt Stamm B 27 bei 70° Ö. nach 3 Tagen das Verhältnis 1 : 84 (16,9 g/l A.), bei 119° Ö. hingegen 1 : 36 (12,3 g/l A.). Obwohl weniger Alkohol gebildet wurde, ist der Gehalt an flüchtiger Säure bei 119° Ö. schon beachtlich größer, während gegen Ende der Gärung die beiden Verhältnisse wieder genähert sind. D 38 weist bei 119° Ö. nach 67 Tagen ein gutes Verhältnis auf. Rasse Steinberg (Original von Geisenheim) weist sehr ungünstige Zahlen auf. Bei 119° Ö. ist nach 3 Tagen nur 11 mal soviel Alkohol als flüchtige Säure gebildet worden und nach 67 Tagen stehen beide immer noch wie 1 : 62, also sehr schlecht. Das Verhältnis ist stets dort am größten, wo die Gärung langsam und schleppend verläuft oder erst in Gang kommt. Die Menge der gebildeten flüchtigen Säure scheint also entsprechend den Temperaturverhältnissen davon abhängig zu sein, wie weit die Mostkonzentrationen von den optimalen Bedingungen abweichen.

Übersicht VI.

Gebildete Menge fluchtige Saure im Vergleich zum Alkoholgehalt in g/l bei verschiedenen Mostkonzentrationen. Fluchtige Säure = 1 gesetzt.

		nach 3 Tagen			nach 7 Tagen			nach 53 (67) Tagen		
		Alk.	fl. S.	Verh.	Alk.	fl. S.	Verh.	Alk.	fl. S.	Verh.
B 27	70° Ö.	16,9	0,20	1 : 84	43,8	0,40	1 : 110	68,8	0,48	1 : 143
	119° Ö.	12,3	0,34	1 : 36	40,2	0,88	1 : 46	123,2	1,00	1 : 123
D 38	75° Ö.	12,9	0,10	1 : 129	47,3	0,34	1 : 139	74,1	0,31	1 : 239
	119° Ö.	13,3	0,32	1 : 42	39,0	0,67	1 : 56	122,6	0,80	1 : 153
Steinberg	75° Ö.	5,8	0,15	1 : 39	43,6	0,59	1 : 74	74,3	0,58	1 : 128
	119° Ö.	1,7	0,15	1 : 11	15,4	0,72	1 : 21	102,2	1,64	1 : 62

c) Einfluß des Eisengehaltes auf den Gärverlauf.

Mit dem Stamm A 29 wurde ein Versuch mit einem eisenhaltigen Most durchgeführt. In den Most wurden vor Beginn des Versuches 24 Std. lang Eisennägel gelegt. Von der Verwendung reiner Eisensalze wurde Abstand genommen, um möglichst natürliche Verhältnisse zu schaffen. Der Eisengehalt wurde mittels des Möslinger Verfahrens zu 3,52 g/hl Fe (= 20 g/hl Kaliumferrocyanid) festgestellt.

Übersicht VII.

	Alkoholgehalt nach 3 Tagen g/l	7 Tagen g/l	48 Tagen g/l	Flüchtige Säure g/l
Ohne Eisen.	21,2	54,8	71,5	0,42
Eisengehalt 3,52 g/hl . .	19,4	54,1	72,0	0,29

Der Versuch zeigt, daß im eisenhaltigen Most nur die Gärungsenergie (nach 3 Tagen) etwas gehemmt war. In der Gärgeschwindigkeit (nach 7 Tagen) trat kein Unterschied zwischen den beiden Mosten auf; auch im Endvergärungsgrad sind beide gleich. Der Gehalt an flüchtiger Säure war in dem eisenhaltigen Most um 0,13 g/l geringer als in dem eisenfreien. Da Moste mit wesentlich höherem als dem angeführten Eisengehalte nur selten vorkommen, kann der Stamm A 29 auch für die Vergärung von stark eisenhaltigen Mosten als sehr gut brauchbar bezeichnet werden.

Zusammenfassung.

1. Aus 1934er Weinen des Kaiserstuhls und Markgräflerlandes wurden einige Hefestämme isoliert, die den Anforderungen der Praxis an eine Reinhefe voll und ganz genügen. Die neuen Stämme weisen eine gute Gärungsenergie und -geschwindigkeit auf, haben einen hohen Endvergärungsgrad und bilden verhältnismäßig wenig flüchtige Säure: ihre Empfindlichkeit gegen schweflige Säure ist sehr gering. Stamm A 29 eignet sich sehr gut für die Umgärung, auch bei einem übernormal hohen Gehalt an flüchtiger Säure. Stamm A 41 ist eine ausgesprochene Kaltgärhefe.

2. Die Kaltgärhefe A 41 ist kältebedürftig. Bei Temperaturen über 20° vergärt sie schwer und stellt bei 27,5° bei etwa 50 g/l Alkohol die Gärung ein. In der Praxis kann eine solche Kaltgärhefe nur dann verwendet werden, wenn der Keller sehr kühl ist und der Most durch die Gärung nicht wesentlich über 20° erwärmt wird.

3. Die Untersuchungen bestätigen, daß der Gehalt an flüchtiger Säure mit der Temperatur wechselt und bei höheren Mostkonzentrationen höher ist als bei niederen, daß zu Beginn der Gärung im Verhältnis zur Alkoholmenge mehr flüchtige Säure gebildet wird als gegen Ende. Aus den Ergebnissen wird abgeleitet, daß die Hefe dann die größte Menge flüchtige Säure erzeugt, wenn sie zum Wachstum und zur Sprossung viel Nährstoffe und Energie braucht und die Temperaturen sowie das Mostgewicht nicht den optimalen Bedingungen entsprechen[1]).

4. Bei Vergärung eines stark eisenhaltigen Mostes mit Stamm A 29 wurde nur zu Beginn der Gärung eine geringe Hemmung bemerkt. Der Endvergärungsgrad war nicht beeinflußt.

Schrifttum.

v. d. Heide, Wein und Rebe. Bd. 8. 1926. S. 3—27. — Krumbholz, Weinbau und Kellerwirtschaft. Bd. 11. 1932. S. 97. — Malkow, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 91. 1934. S. 161. — Osterwalder, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 90. 1934. S. 226. — Reinesch, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 90. 1934. S. 218. — Stelling-Dekker, Die Hefesammlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures. I. Delft. — Badisches Weinbauinstitut, XV. Jahresbericht für das Jahr 1935.

[1]) Zur Bekräftigung dieser Annahme laufen noch weitere Untersuchungen.

Nachdruck verboten.

Studies on Bacterial Pigmentation[1]).

II. Growth Requirements[2]).

By **Roger D. Reid,**

Division of Bacteriology, The Pennsylvania State College,
State College, Pennsylvania.

Since antiquity the chromogenic bacteria have commanded the attention of scientists. In 1823 Bizio named the red fungus which had caused an epidemic of red coloring on foods, Serratia marcescens Previous to this time it is quite likely that the "Blood Miracles" such as that recorded by Curtius Rufus in "Alexandri Magni, Regis Macedonium" (Libr. IV, p. 52, edited by L. Schmitz and C. G. Zumpt, 1852) and others which incited individual and wholesale murder of Jews during the Middle Ages were caused by such pigmented microorganisms.

More recently the chromogens have been studied in some detail with considerable attention having been given to the chemical nature of the pigments and their possible rôle in the metabolism of the cell. In many instances the color of the pigmented bacteria has been used as a basis of classification. To some extent this is continued in our present system, although other factors are much more satisfactory as a basis of organization and scarcely a single group now exists in the system of classification of the Society of American Bacteriologists which does not contain some pigmented species.

Despite the study which has been given chromogenic bacteria in the past, present knowledge concerning the function of the pigment or the factors influencing their production is comparatively little. The chemical nature of the pigments of several species has been studied in some detail and a formula has been determined for some.

Early investigations in which an attempt was made to determine the nature of bacterial pigments were those of Lankester (1873), who named the pigment of Bacterium rubescens, a purple sulfur bacteria, bacteriopurpurin. He found that this pigment was insoluble in ordinary solvents but later investigators were unable to verify this fact.

Molisch (1907) reported on the pigments obtained from purple bacteria. Two separate fractions were obtained, one by extraction with absolute alcohol was green. To this he gave the name bacteriochlorin although it was unlike chlorophyll. After this fraction was removed a second could be extracted with chloroform and carbon disulfide which was orange-red to carmine or garnet red. He called this pigment pure bacteriopurpurin. By spectroscopic studies he found that bacteriopurpurins differed with the species studied.

Bacteriochlorin from sulfur-free purple bacteria was studied by methods used in chlorophyll chemistry by Noack and Schneider (1933). They found that the principal difference between this pigment and plant chlorophyll lies in their respective spectra. These studies were continued by Schneider (1934) who obtained two modifications of bacteriochlorophyll one of which, the B modification, has the same elementary composition as chlorophyll B.

---

[1]) A portion of a thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy. The Pennsylvania State College, 1935.

[2]) Authorized for publication as paper No. 707 in the Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station.

Reilly and Pyne (1927) gave the formula $C_{50}H_{59}O_{15}N_5$ to the pigment produced by Chromobacterium violaceum, but Wrede and Rothhaas (1934) concluded that the pigment of Chromobacterium violaceum has the formula either $C_{42}H_{35}O_6N_5$ or $C_{50}H_{42}O_8N_6$ and probably contains one or more phenolic OH groups.

Tobie (1935) made detailed studies on the production, extraction and purification of the purple pigment, "violacein".

One of the earliest investigations on the organisms producing red pigments was that of Schroeter (1872) who studied the pigments of Serratia marcescens and found that they did not give the color reactions of carotenoids. The orange-red alcoholic extract he obtained turned red when treated with acid and yellow when treated with alkali. The empirical formula $C_{30}H_{56}NO_5$ was given to this pigment by Griffith (1892) and spectroscopic studies were made by Samkow (1903).

Wrede and Hettche (1929) were able to obtain prodigiosin in a purer form than previously. From this they determined the formula to be $C_{20}H_{25}N_3O$. Subsequent papers by Wrede (1932), Wrede and Rothhaas (1933) have presented data to prove the structure of this pigment. These authors think that prodigiosin is probably a tripyrrylmethine, but the exact location of the substituents has not yet been determined.

Zopf (1889) studied solubilities and adsorption characteristics of the pigments of organisms he described and named Micrococcus rhodochrous and Micrococcus erythromyxa both of which produce coral to blood red colonies. He named the class of pigments of which these were members liporhodins. The ability of organisms to produce these pigments became the characteristic of the new genus Rhodococcus of Zopf. He developed the lipocyan reaction in which a blue coloration develops when concentrated sulfuric acid is added to the pigment.

Zopf (1889) continued his studies on the organisms producing yellow pigments. He described those of Bacterium egregium, Bacillus chrysogloia and Staphylococcus aureus as lipoxanthins. They were found to give the lipocyan reaction and were concluded to be lipochromes. Schroeter (1895) verified this in the case of Staphylococcus aureus and added the pigment of Sarcina aurantiaca to the group of lipochromes. Zopf also studied the pigment of Bacterium egregium in detail and named it bacterioxanthin because he believed that it resembled the anthoxanthin of the rose.

The pigment of Pseudomonas aeruginosa has been studied rather more extensively than that of other organisms probably because of the toxicity of the pigment and the occasional pathogenicity of the organism. The pigment was isolated by Fordos in 1860. Gessard (1882, 1891, 1892, 1901 and 1902) made many contributions to our knowledge of this pigment and named it "pyocyanin" Wrede (1924), Wrede and Strack (1928) and Wrede (1930) have presented the most complete study of the chemistry of pyocyanin. They ascribe the formula $C_{26}H_{24}N_4O_2$ to it. By prolonged hydrolysis with acids they obtained hemipyocyanin ($C_{13}H_{12}N_2O$), two molecules of which the authors think are found in one of pyocyanin.

Van Veen and Mertens (1933) reported a food poisoning outbreak in Java as owing its toxic property to the pigment produced.

Beijerinck (1913) reported on a black pigment, found to be melanin, which arose from the oxidation of homogentisic acid produced from tyrosine by the symbiotic growth of certain species of bacteria and actinomyces.

Battaglia (1932) found that the black pigment produced in cultures of Mycobacterium tuberculosis was melanin which was produced by the action of tyrosinase upon tyrosin. Mastroemi (1932) found that pigment produced by brucella organisms on egg-containing media was due to oxidation of tyrosine to products of melanin type.

With regard to the biologically active pigments produced by bacteria, it is interesting to note that Bechdel, Honeywell, Dutcher and Knutsen (1928) isolated an organism, Flavobacterium vitarumen (Nov. Sp.) from the rumen of a cow and found that it synthesized vitamin B. This organism produces a pigment but the connection between pigmentation and vitamin synthesis, if any, was not demonstrated.

That certain chromogenic bacteria produced pigments belonging to the carotenoid group had been indicated by Zopf (1889), Schroeter (1895) and others, when Krainsky (1914) concluded that red pigments of certain actinomyces belong to the carotin group while the yellow pigments of a micrococcus and of Sarcina lutea do not. Later, however, Chargaff and Dieryck (1932) studied the

pigments of Sarcina lutea and found that it contained two carotene pigments and in 1933, Chargaff found that one is a hydrocarbon and the other is a xanthophyll. He also found that Sarcina aurantiaca contains beta carotene and a partially esterified zeaxanthin, while Mycobacterium phlei contains beta and gamma carotenes. Fink and Zenger (1934) isolated two carotenoids from a red yeast. They make the assumption that the great number of carotenoids found in microorganims is a mixture of few pigments in various proportions.

Skinner and Gunderson (1932) were able to cure xerophthalmia and bring an increase in body weight of young rats by supplementing a vitamin A free diet with one gram of the dried bacterial growth of an unidentified diphtheroid grown in total darkness on vitamin A-free media. Baumann, Steenbock, Ingraham and Fred (1933) and Ingraham and Baumann (1934) found appreciable amounts of carotene in cultures of corynebacterium (and other bacteria). They do not believe that vitamin A is synthesized by bacteria but that carotene alone is responsible for its biological activity.

Heiduschka and Lindneu (1929) found that Clostridium butyricum was able to synthesize ergosterol, the precursor of vitamin D. A similar finding was made by Groaves (1935) in the case of Azotobacter chroococcum, which was grown on a synthetic medium containing no vitamin D or its precursor. By irradiation this synthetic product was transformed into vitamin D which was proven in potency by animal tests.

Chargaff and Lederer (1935) found at least two species of acid-fast bacteria produce carotenoid pigments. The chemistry of the pigments found in the tubercle bacillus has been studied by Anderson and Newman (1933) who isolated a pigment corresponding to the formula $C_{11}H_8O_3$ from the acetone soluble fat of the human (H. 37) strain. Further study of this pigment and its synthesis was made by Newman, Crowder and Anderson (1934). They named the pigment "phthiocol".

In this review the work of Kögl and Postowsky (1930) who described the chemistry of a pigment which they call "chloraphine" produced by the growth of Bacillus chlororaphis, should be mentioned and the review of the chemical studies on natural pigments including those found in bacteria, by Bergman (1933) is of value to those interested.

Thus the emphasis upon the chromogenic bacteria has passed to a study of those producing pigments possessing biological activity and the chemistry of the pigment. The conditions under which these organisms may be grown with maximum yield and pigment production have not been considered particularly. Since the publication of Sullivan's paper in 1905 little work has been done to show which factors affect pigmentation when more than one or a small group of organisms were being studied. Sullivan's work was intended to show that bacteria could grow and produce pigment on synthetic media. That being done, it was felt that the composition of the media which showed good pigmentation by many bacteria should be determined and the elements or compounds necessary.

Organisms Studied.

Cultures used in this investigation were obtained from a variety of sources, such as air, soil, milk and water. These were identified and classified to genus and species, whenever possible, according to Bergey's Manual. Other cultures needed to complete a representative list were obtained from the Type Culture Collection of the Society of American Bacteriologists.

Methods.

Unless otherwise indicated the reaction of all media was adjusted colorimetrically to pH 6.8—7.2. Sterilization was in the autoclave for 15 minutes at 15 pounds pressure. When di- or polysaccharides were present the pres-

Table 1. Cultures Studied.

Culture Number	Identification	Culture Number	Identification
1	Serratia marcescens (A)	89	Phytomonas solanacearum
19	Serratia fuchsinous	119	Phytomonas vascularum
34	Serratia marcescens (B)		
		5	Flavobacterium vitarumen
2	Sarcina lutea (A)	23	Flavobacterium sp. (?)
3	Sarcina lutea (B)	59	Flavobacterium flavotennae
4	Sarcina lutea (C)	6	Flavobacterium xanthium
32	Sarcina lutea (D)	7	Flavobacterium maris
33	Sarcina citrea		
55	Sarcina sp. (?)	9	Chromobacterium chocolatus n. sp.
60	Sarcina psychrocarteria		
		10	Chromobacterium violaceum
8	Micrococcus sp. (?)	28	Chromobacterium sp. (?)
11	Micrococcus chocolatus	115	Chromobacterium sp. (?)
13	Micrococcus subflavescens		
22	Micrococcus auranticus	14	Spirillum rubrum
25	Micrococcus luteolus	18	Spirillum serpens
26	Micrococcus eatonii		
27	Micrococcus subcitreus	35	Corynebacterium sp. (?)
57	Micrococcus cereus	51	Corynebacterium sp. (?)
101	Micrococcus sp. (?)	52	Corynebacterium sp. (?)
102	Micrococcus sp. (?)	53	Corynebacterium sp. (?)
106	Micrococcus sp. (?)		
		85	Mycobacterium phlei
99	Torula sp. (?)	86	Mycobacterium butyricum
140	Torula sp. (?)		
		29	Bacterium sp. (?)
12	Staphylococcus aureus (A)	56	Bacterium sp. (?)
31	Staphylococcus aureus (B)	91	Bacterium bookeri
15	Staphylococcus citreus (A)	114	Bacterium sp. (?)
30	Staphylococcus citreus (B)		
		95	Escherichia acidilactici
54	Rhodococcus rhodochorus (A)	116	Escherichia sp. (?)
96	Rhodococcus rhodochorus (B)		
97	Rhodococcus roseus	103	Propionobacterium jensenii
		104	Propionobacterium rubrum
24	Bacillus niger	105	Propionobacterium thoenii
17	Bacillus sp. (?)		
58	Bacillus sp. (?)	107	Vibrio tyrogenus
90	Bacillus lactimorbus		
		109	Thiosarcina rosea
20	Actinomyces sp. (?)		
21	Actinomyces reticuli	111	Azotobacter vinelandi
3320	Actinomyces flavovirens	118	Azotobacter chroococcum
3348	Actinomyces ruber		
3356	Actinomyces viridochromogenus	92	Erwinia carotovora
87	Achromobacter globiforme	93	Pseudomonas aeruginosa
		94	Pseudomonas ureae
88	Cellumonas biazotea		

sure was not allowed to exceed 12 pounds and in some instances the time was shortened to prevent too great a degree of hydrolysis.

The media were inoculated uniformly by use of a platinum loop, making one streak up the center of the slant, beginning at the butt. Cultures were incubated at 20—22° C. for one week and at the end of that time obser-

vations were made. The amount of pigment obtained was compared with that obtained on standard nutrient agar containing one per cent glucose grown under identical conditions. Differences in shade or tint of pigment were classified by comparing with standards of Maerz and Paul, "Dictionary of Color" (1930).

In regard to the effect of temperature on the production of bacterial pigments, little work was required to reiterate what is generally known that within the growth range of the organisms which produce pigment, lower temperatures favor pigmentation and higher temperatures inhibit it. While this was found to be true in the case of the Mycobacteria, growth is so slow below the optimum (37° C.) that it is not practical to attempt to cultivate them at lower temperatures.

No pigment was produced when the bacteria were grown under anaerobic conditions of any sort. Abundant growth occurred in freshly inoculated tubes sealed with "Gelcaps"[1]) but lack of oxygen prevented pigmentation.

From these facts it was postulated that pigments are produced more abundantly at 20° C. than 37° C. because the increased metabolism of the cells does not allow pigmentation to take place. It was suggested that since oxygen is necessary for pigmentation, more easily accessible oxygen in the medium and atmosphere would permit pigmentation even at 37° C. To see what the effect might be, oxygen gas was passed through lactose broth cultures of Serratia marcescens incubated at 37° C. A control into which no oxygen was passed was incubated at the same temperature. Daily observations for a period of ten days failed to indicate any greater degree of pigmentation in the oxygenated cultures than in the controls.

This seems to be in agreement with the findings of Schneider (1935) who studied Rhodobacillus palustris (Molisch). He determined that the optimum oxygen tension for the production of bacteriopurpurin was 2%. The organism can develop in oxygen-free atmosphere but no pigment is produced. He did not vary the temperature.

Kazakow and Kotschergina (1935) reported that 0.1 cc. of a saturated solution of sodium chloride added to 5 cc. of broth cause pigment production by Serratia marcescens at 37° C. In attempting to duplicate this experiment no difference was observed either at 37° C. or 22° C. in the amount of pigmentation in media containing various amounts of salt and that not containing salt.

Effect of Reaction.

The reaction of several media was adjusted colorimetrically over a range of pH 6.0—8.4. It was found that below pH 6.6 or above 8.0 pigmentation became less marked. Within this range differences in reaction had little effect upon the production of pigment although changes in shade or tint were detectable.

Experiments with Media Suggested in the Literature.

In the beginning of this investigation several media which had been reported as being valuable in the cultivation of certain chromogenic organisms were used to determine how useful they might be as general media

[1]) Gelcaps-trade name of a gelatin cap made by Paeke Davis & Co.

Table 2. Compo-
(In addition to ingredients listed, each medium contained

Medium Number	Reference	Glucose	Maltose	Mannitol	Glycerol	Starch	Bacto Peptone	Witte's Peptone	Yeast Water	Asparagin
2	Bauman et al (1933)	10.0	—	—	—	—	—	—	100 cc.	—
431	Milburn (1904) . .	50.0	—	—	—	—	—	—	—	20.0
431B	Krainsky (1914) . .	10.0	—	—	—	—	—	—	—	0.5
434	Davis (1915) . . .	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—
453	Sackett (1912) . .	—	—	15.0	—	—	—	—	—	—
489	Sackett (1912) . .	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—
489A	Sackett (1912) . .	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—
489B	Sackett (1912) . .	20.0	—	—	—	—	—	—	—	—
489C	Sackett (1912) . .	20.0	—	—	—	—	—	—	—	5.0
489D	Sackett (1912) . .	20.0	—	—	—	—	—	5.0	—	—
506	Groenewege (1913) .	—	10.0	—	—	—	—	—	—	10.0
507	Noyes (1906) . . .	—	—	—	—	1.0	—	—	—	10.0
508	Conn (1921) . . .	—	—	—	—	2.0	—	—	—	—
513	Conn (1921) . . .	—	—	—	10.0	—	—	—	—	—
540	Molisch (1907) . .	—	—	—	—	—	10.0	—	—	—
573	Molisch (1907) . .	—	—	—	5.0	—	5.0	—	—	—
584	Fred et al (1934) .	—	5.0	—	—	—	5.0	—	—	—
589	Sullivan (1905) . .	—	—	—	20.0	—	—	15.0	—	—

Note-Figures in above table represent grams.

for pigmented bacteria and to get, perhaps, a clue as to the elements and nutrients useful or dispensable in the growth of chromogens.

The media in this group with references to the literature where it was first used is given in Table 2.

It was found that best growth and pigmentation by all organisms studied was obtained with Sullivan's Medium (No. 589). The constituents of this medium not found in others of the group, are ammonium lactate and a trace of manganese tartrate.

Second best of the group from the standpoint of producing pigment was Sackett's (489 D) which contains only Witte's peptone and glucose. Later experiments showed all peptones plus glucose were satisfactory bases for media used to produce pigment.

Medium 434, Davis, was without value since growth was slight and pigmentation entirely lacking. This medium, it will be noted, contained no nitrogen and later experiments showed that nitrogen is essential to pigmentation regardless of the sugar or inorganic salts used.

The medium number 2, used by Baumann and co-workers did not yield good pigment. Our failure to obtain pigment on this medium may have been due to a difference in our method of preparing the yeast water which was not described by them.

It was found with this group of media that asparagin, ammonium lactate or ammonium chloride were superior to $NaNO_3$ or $(NH_4)_2SO_4$, as a source of nitrogen.

It did not seem that sodium chloride was necessary in producing pigment but traces of certain inorganic salts enhance the results.

sition of media.
15 gms. agar-agar and 1000 cc. distilled water.)

Ammonium Lactate	Sodium Asparaginate	$NaNO_3$	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl	Na_2CO_3	Na_2HPO_4	Na_2SO_4	NaCl	K_2HPO_4	$CaSO_4$	$FeSO_4$	$MgSO_4$	Manganese Tartrate
—	—	—	—	1.0	—	—	—	1.0	1.0	—	—	1.0	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	5.0	—	—	—	—	—
—	—	13.0	—	—	2.0	—	9.0	20.0	—	9.0	—	1.5	—
—	—	5.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	5.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	5.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	2.0	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	—	—	—	—
—	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	1.0	—	—	—	—	—	—	—	0.5	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	—	Trace	0.5	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	5.0	—	—	—	—	—	—	—
0.5	—	—	—	—	—	—	—	3.0	1.5	—	Trace	0.5	Trace

Effect of Carbohydrates without Nitrogen.

Media were prepared from agar agar, distilled water and 5.0 grams of one of the following carbohydrates; dextrose, mannose, galactose, levulose, lactose, maltose, sucrose, dextrin, salicin, xylose, raffinose, rhamnose, 10 grams starch or 50 cc. glycerol per liter. After incubation for 14 days at 20° C. in the dark, the presence of pigment was found to be entirely lacking, giving evidence of the lack of some substance in these media essential to pigmentation. Slight growth was obtained in most cases.

Nitrogen-free Media Containing Inorganic Salts.

Several media were prepared by using various modifications of Crone's solution (Fred, Baldwin and McCoy 1932). These media contained all of the salts necessary for bacterial growth, with glucose as a source of carbohydrate, but entirely devoid of nitrogen in any form. The growth on such media was satisfactory and in several instances very slight pigmentation was noted.

It should be observed that the pigmentation, when present, was more intense at the top, thin portion of the slant. Ammonia-free distilled water was not available for use in this experiment and the fumes of the laboratory could reach these cultures during the period of incubation. This might account for the pigment production obtained although in other experiments in which ammonia gas was used to supplement the atmosphere it was not possible to find a concentration of gas which would increase the pigmentation on nitrogen-free media.

Bacto peptone or nutrose when added to Crone's solution agar enhanced pigmentation. Asparagin, indol and tryptophane did not cause

any greater pigment formation when added to this basic nitrogen-free medium.

Effect of Amino Acids.

When 0.1 per cent of the various amino acids were used in a medium containing only agar agar and distilled water, faint growth was obtained, and only with cystine, 1-proline, aspartic acid, 1-hydroxy proline, valine, tyrosine and alanine was pigment produced. Certain other amino acids actually seemed to inhibit pigmentation. These were glutamic acid, histidine (hydrochloride) cysteine, lysine and glycine. In the case of certain amino acids larger amounts, up to 1.0 per cent were used without any appreciable difference in the results. The reaction of these media was adjusted to neutral.

Media containing amino acids in amounts varying so that the nitrogen in each liter of medium was the same regardless of the percentage of the element in the molecule was prepared. Inorganic salts were added in sufficient quantity to support growth but pigmentation was not noticeably different than in the preceding experiment.

Natural combinations of amino acids were utilized. by adding to basic media such compounds as Difco-tryptone, urea, egg albumin, gelatin, casein, Difco peptone, beef extract, whey and whole egg. It was found that Difco tryptone, whole egg, gelatin, casein and whey media produced more luxurious pigmentation than urea and purified egg albumin media.

Difco tryptone, with or without glucose, was a very satisfactory medium for the production of pigment. Whole egg medium made according to Dorset's formula was excellently adapted to pigment production, and a medium consisting of whey, Difco peptone, sodium chloride, agar agar and distilled water was also useful in producing good yields of pigment.

The results obtained with these various media based upon a consideration of the amino acids present in the various compounds used in the media (Mathews 1930) lead to the conclusion that the stimulating effect of nitrogen upon pigmentation is rarely found, and then only slightly, in a single amino acid, but is due to certain intricate combinations of them in natural compounds. Among the proteins there are found compounds which may be lacking in the particular group or combinations that stimulate chromogenesis.

When a protein compound was found which produced good pigmentation the addition of glucose did not particularly enhance chromogenesis, which indicates that pigmentation is not dependent upon the carbohydrate but rather upon an adequate and available source of nitrogen.

Types of Peptones.

Various brands of peptone were used in preparing media free of carbohydrate. There was very little difference noted in the results obtained with any of these and it may be concluded that only in isolated cases may one be superior to others. There is no doubt that such instances do occur (Deskowitz and Buchbinder 1935) but in general one peptone is as satisfactory as the next. It is evident from our results, as already indicated, that Difco tryptone is a very good base for media to be used in producing pigment.

Effect of Mineral Salts.

Certain recent investigations have indicated considerable discrepancy in the value or effect of calcium on pigmentation.

Bordet (1930) found that an oxalated medium enhanced the red pigment produced by Serratia marcescens and the presence of calcium caused the production of a pale or almost colorless colony. Seppilli (1931) stated that in many cultures of chromogenic bacteria the pigments are not produced in the presence of calcium salt but pigmentation takes place readily if calcium is eliminated with sodium oxalate treatments. Rippel and Stoess (1932) found that calcium is not generally essential to the life of microorganisms but it favors growth in certain instances. Bordet and Renaux (1930) found that certain morphological changes were brought about by addition of calcium to the media.

The influence of iron on the production of pigment has been described for Bacillus bruntzii (n. sp.) by Nepreux (1920). He found that this organism produces a red pigment only when iron is present in the medium.

Reed and Rice (1924) presented data to show that yellow, brown or red pigmentation in acid-fast bacteria is related to the presence of iron in the medium. If the iron is allowed to precipitate, pigment formation is prevented. They state that non-acid-fast bacteria are not so markedly affected by the presence of iron as are the acid-fast types. Somewhat in disagreement with this idea is that of Kraus and Konef (1933) who stated that iron is utilized in metabolism and pigment formation but that it is not essential. They studied two acid-fast strains.

Other elements seem to be associated with various biological pigments, that is, chlorophyll contains magnesium; hemocyanin a blue pigment found in the blood of mollusks and crabs, reported to contain copper and manganese is found in the respiratory pigment of the tropical mussel. Media were prepared making use of these elements in forms which should have been available to the bacteria being studied. The elements used were manganese lactate and tartrate, calcium oxalate and lactate, potassium oxalate, ferrous oxalate, magnesium oxalate, cupric oxalate, acetate and lactate. To these media was added 1 per cent glucose, agar agar and distilled water. Only atmospheric nitrogen was available. Slight growth was obtained on all media with most of the organisms but in no case was more than a trace of pigment produced. It was thought that this lack of growth was probably due to the oligodynamic action of metals.

If pigments are enhanced by the presence of inorganic materials in the media it is evident that nitrogen must be furnished. Referring to the tryptone media it will be remembered that no metal was added yet pigmentation was abundant.

Summary and Discussion.

Seventy-six cultures representing 24 genera of chromogenic bacteria, or bacteria occasionally showing chromogenesis, were collected and studied.

A total of 96 media having different composition were used. With these it was attempted to determine which factors and substances favored and which inhibited pigment formation.

It was shown that peptone, ammonium lactate, manganese tartrate and various other inorganic salts, used with a favorable basic medium, stimulate pigmentation. Sodium chloride does not affect pigmentation and is not required by most chromogens in order to produce pigment.

Very slight or no pigment was produced when the media contained no nitrogen and had only a single carbohydrate as source of energy. Carbohydrates are not inhibitive to pigmentation but in these media lack of nitrogen and inorganic salts prevented its production.

In media containing the necessary inorganic salts and carbohydrates for growth and energy but lacking in nitrogen, slight pigment was produced. Pigment was more marked in media which showed the $(PO)_4$ radical in its composition. The fortification of these media with various nitrogenous com-

pounds such as peptone resulted in satisfactory pigmentation, while the addition of urea to similar media did not appreciably stimulate pigment production.

Difco tryptone, Dorset's egg medium, gelatin and casein were found to be good sources of nitrogen when used with or without a carbohydrate. Amino acids as a sole source of nitrogen were generally not useful in stimulating pigmentation even though glucose was used as a source of energy.

Media containing organic compounds of metals found in other natural pigments were not conducive to bacterial pigmentation.

The effect of reaction of the medium on chromogenesis was determined by varying the reaction of several of the media from pH 6.0 to 8.4. Below pH 6.6 the more acid the reaction the poorer the pigmentation. An increase in pH to 8.0 had no apparent effect upon chromogenesis. Above that point pigment production was inhibited with most of the organisms but not so marked as with an increase in hydrogen ion concentration.

Growth were most satisfactory and pigmentation most profuse at room temperature (20—22° C.) while a higher temperature inhibited chromogenesis and at lower temperature growth was retarded so that it could not be used in the study of chromogenesis.

Conclusions.

1. Pigmentation by bacteria is governed by a variety of factors. The presence of one or several of these may be adequate to produce sufficient pigment so that the absence of some other factors will not be noticed.

2. The principal element essential for producing pigment in bacteria is nitrogen. This may be present in forms which are not available to some chromogens.

3. Carbohydrates (starch and sugars) increase pigmentation, probably by virtue of stimulating the amount of growth, when added to media containing a good source of nitrogen and the essential inorganic constituents, but in the absence of nitrogen and inorganic salts are not able to support pigment production.

4. Organic metallic compounds do not favor pigmentation.

5. The optimum reaction for pigment production is between pH 6.6 and 8.0.

6. The results obtained from this study are illustrative of conflicting results to be obtained when a large group of organisms of diverse characteristics are studied. The factors influencing pigment production in one culture may differ considerably from those affecting it in others. The preceding experiments indicate the most important factors which may influence pigmentation, but more extensive investigations with individual or single groups of organisms is indicated.

Bibliography.

1. Anderson, R. J., and Newman, M. S., Journ. Biol. Chem. Vol. 101. 1933. p. 773—779. — 2. Battaglia, M., Boll. Soc. Intern. Microbiol. Sez. Ital. Vol. 4. 1932. p. 410—412. — 3. Bauman, C. A., Steenbock, H., Ingraham, M. A., and Fred, E. B., Journ. Biol. Chem. Vol. 103. 1933. p. 339—351. — 4. Bechdel, S. I., Honeywell, H. E., Dutcher, R. A., and Knutsen, M. H., Journ. Biol. Chem. Vol. 80. 1928. p. 231. — 5. Beijerinck, M. W., Folia Microbiologica. Vol. 2. 1913. p. 123—134. — 6. Bergman, E., Ergebnisse Physiol. Bd. 35. 1933. S. 158—300. — 7. Bordet, J., and Renaux, E., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 45. 1930. p. 1—25. — 8. Chargaff, E., Compt. rend.

T. 197. 1933. p. 946—948. — 9. Chargaff, E., and Dieryck, J., Naturwissenschaften. Bd. 20. 1932. S. 872—873. — 10. Chargaff, E., and Lederer, E., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 54. 1935. p. 383—388. — 11. Conn, H. J., New York Agr. Expt. Sta. Techn. Bull. 83. 1921. — 12. Davis, D. J., Journ. Inf. Dis. Vol. 17. 1915. p. 174—182. — 13. Deskowitz, M. W., and Buchbinder, L., Journ. Bact. Vol. 29. 1935. p. 293—298. — 14. Fred, E. B., Baldwin, I. L., and McCoy, E., "Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants." (Univ. of Wisconsin Studies in Science. Vol. 5. 1932. p. 266.) — 15. Fink, H., and Zenger, E., Wochenschr. f. Brau. Bd. 51. 1934. S. 89—93. — 16. Fordos, Compt. rend. Acad. de Sc. Par. T. 51. 1860. p. 215—217; ibid. T. 56. 1863. p. 1128—1131. — 17. Gessard, C., These de Paris. 1882. p. 7—68. — 18. Gessard, C., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 5. 1891. p. 65—67. — 19. Gessard, C., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 6. 1892. p. 801—823. — 20. Gessard, C., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 15. 1901. p. 818—823. — 21. Gessard, C., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 16. 1902. p. 313—330. — 22. Greaves, J. E., Journ. Bact. Vol. 30. 1935. p. 143—148. — 23. Groenewege, J., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. 1913. S. 16—31. — 24. Heiduschka, H., and Lindneu, H., Ztschr. Physiol. Chem. Bd. 181. 1929. S. 15—23. — 25. Ingraham, M. A., and Baumann, C. A., Journ. Bact. Vol. 28. 1934. p. 31—40. — 26. Kazakow, A., and Kotschergina, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 88. 1933. S. 144. — 27. Kögl, F., and Postowsky, J. J., Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 480. 1930. p. 280—297. — 28. Krainsky, A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1914. S. 129—138; 257—276. — 29. Kraus, R., and Konef, O., Ztschr. f. Tuberk. Bd. 67. 1933. S. 42—48. — 30. Lankester, E. R., Quart. Journ. Micr. Sc. T. 13. 1875. p. 408—424. — 31. Maerz, A. J., and Paul, M. R., "Dictionary of Color", McGraw-Hill Book Co., N. Y. 1930. — 32. Mastroemi, M., Boll. Soc. Intern. Microbiol. Sez. Ital. T. 4. 1932. p. 268—272. — 33. Mathews, A. P., "Physiological Chemistry", William Wood and Co., N. Y. 1930. — 34. Milburn, Th., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. S. 129—138; 257—276. — 35. Molisch, H., Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen. (Gustav Fischer, Jena 1907.) — 36. Nepreux, F., Compt. Rend. Soc. de Biol. Paris. T. 83. 1920. p. 742—743. — 37. Newman, M. S., Crowder, J. A., and Anderson, R. J., Journ. Biol. Chem. Vol. 105. 1934. p. 279—282. — 38. Noack, K., and Schneider, E., Naturwissenschaften. Bd. 21. 1933. S. 835.) — 39. Noyes, H. A., Journ. Bact. Vol. 1. 1906. p. 93—94. — 40. Reed, G. B., and Rice, C. E., Journ. Bact. Vol. 17. 1924. p. 407—411. — 41. Reilly, J., and Pyne, G., Biochem. Journ. Vol. 21. 1927. p. 1059—1064. — 42. Rippel, A., and Stoess, U., Arch. Mikrobiol. Bd. 3. 1932. S. 492—506. — 43. Sackett, W. G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. S. 81—115. — 44. Schneider, E., Physiol. Chem. Bd. 226. 1934. S. 221—254. — 45. Schneider, E., Beitr. Biol. Pflanzen. Bd. 18. 1935. S. 81—118. — 46. Schroeter, J., Beiträge zur Biologie der Pflanzen; herausgeg. von F. Cohn, Bd. 1. 1872. Heft 2. S. 109. — 47. Schroeter, Quoted from Buchanan and Fulmer, Physiology and Biochemistry of Bacteria. Waverly, Press, Baltimore, Md. 1895 (1928). — 48. Seppilli, A., Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiol. T. 3. 1931. p. 178—182. — 49. Skinner, C. E., and Gunderson, M. F., Journ. Biol. Chem. Vol. 97. 1932. p. 53—56. — 50. Sullivan, M. X., Journ. Med. Res. Vol. 14. 1905. p. 109—160. — 51. Tobie, W. C., Journ. Bact. Vol. 29. 1935. p. 223—227. — 52. Van Veen, A. G., and Mertens, W. K., Proc. Konink. Akad. Wetensch. Amsterdam. Bd. 36. 1933. S. 666—670. Seen in Nutrition Abst. a. Rev. — 53. Wrede, F., Dtsch. med. Wochenschr. Bd. 50. 1924. S. 1649. — 54. Wrede, F., and Strock, E., Hoppe-Seyler, Ztschr. f. Phys. Chem. Bd. 177. Heft 3/4. 1928. S. 177—186. — 55. Wrede, F., and Hettche, O., Ber. Bd. 62 B. 1929. S. 2678—2685. — 56. Wrede, F., Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh. Bd. 111. 1930. S. 90. — 57. Wrede, F., Ztschr. Physiol. Chem. Bd. 210. 1932. S. 125, 128. — 58. Wrede, F., and Rothhaas, A., Ztschr. Physiol. Chem. Bd. 215. 1933. S. 67—78. — 59. Wrede, F., and Rothhaas, A., Ztschr. Physiol. Chem. Bd. 219. 1933. S. 267—274. — 60. Wrede, F., and Rothhaas, A., Ztschr. Physiol. Chem. Bd. 223. 1934. S. 113—118. — 61. Zopf, W., Ztschr. f. wiss. Mikrobiol. Bd. 6. 1889. S. 172—184. — 62. Zopf, W., Bot. Zeit. Bd. 47. 1889. S. 54—61.

Nachdruck verboten.

Über Beziehungen zwischen Schweinehaltung und dem Vorkommen von Milchsäurestreptokokken in Milch und Milchprodukten.

Das „gewöhnliche" Milchsäurebakterium.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preuß. Versuchs- und Forschungsanstalt in Kiel.]

Von **Folke Bång**, Stockholm.

A. Einleitung.

In der Wirtschaft der meisten Länder nimmt die Milchwirtschaft einen bedeutenden Platz ein. Milch und Milchprodukte gehören zu den wichtigsten Lebensmitteln. Da jedoch die Milch gegen äußere Einflüsse sehr empfindlich ist, und deshalb zum Genuß oder zur Bereitung von Meiereiprodukten ungeeignet werden kann, treten manchmal große Schwierigkeiten auf. Diese zeigen sich nicht zuletzt gerade bei der Butterfabrikation. Geringe Haltbarkeit, verschiedene Geschmacksfehler und ungleichmäßige Qualität verursachen vielfach in den Betrieben erhebliche Verluste. 60—70% aller Butterfehler beruhen auf unbekannten Einflüssen, und oft müssen die Meiereien gegen einen unbekannten Gegner kämpfen. Man muß daher die schädigenden Faktoren zu erforschen suchen, um der Schwierigkeiten Herr zu werden; aber ebenso muß man versuchen, die Voraussetzungen zu einer guten Produktion zu schaffen. Der letztere Weg wird vielleicht manchmal eher zur Erzielung eines guten Produktes führen als der erste. Der Standard der Milchprodukte, den ein Land einnimmt, beruht wohl auf einem Zusammenwirken verschiedener, mehr oder minder wichtiger Faktoren. Diese können von direktem oder indirektem Einfluß, chemischer physikalischer und physiologischer Art sein.

Betreffs der Butterproduktion gibt es kein Land, das hinsichtlich Haltbarkeit und Qualität so hoch steht wie Dänemark. Dies kommt auch dadurch zum Ausdruck, daß die dänische Butter auf dem Weltmarkt im allgemeinen die höchsten Preise erzielt. Dänemark ist bekannt durch seine vorzügliche Meiereiorganisation und den guten Zustand seiner Meiereien. Aber Organisation und Zustand der Meiereien sind nicht allein entscheidend für die Qualität der Meiereiprodukte eines Landes, denn gut gehaltene Meiereien gibt es auch in anderen Ländern. Auch bei gut gehaltenen Meiereien ist es noch nicht sicher, daß die Meiereiprodukte von hoher Qualität sind. Daher ergab sich die Frage, worin der Grund dafür zu suchen war, daß die Qualität der dänischen Meiereiprodukte, speziell der Butter, gegenüber derjenigen der meisten anderen Länder besser ist. Ein Umstand, hinsichtlich dessen Dänemark sich von allen Ländern unterscheidet und der deshalb besondere Aufmerksamkeit auf sich lenkte, ist die große Schweinezucht, die in Dänemark an allen Milchproduktionsorten betrieben wird. Auch auf kleinen Gütern werden in Dänemark sehr viel Schweine gehalten. Aus Gründen einer sparsamen Bewirtschaftung des in Dänemark ziemlich kostbaren Ackerlandes werden die landwirtschaftlichen Gebäude, Stallungen usw. auf möglichst engem Raum zusammengefaßt. Da also der Gutshof

als solcher verhältnismäßig klein, die Schweinezucht aber groß ist, so gibt letztere dem Gutshof in Dänemark das ihm eigentümliche Gepräge.

Der Hauptanteil aller gewonnenen Milch wird in Dänemark für die Butterproduktion benötigt. Magermilch, Buttermilch und Molke werden als Schweinefutter verwendet; Schweinezucht und Milchproduktion sind dadurch in Dänemark eng verknüpft und werden sozusagen Hand in Hand betrieben.

In Kenntnis der engen Beziehungen zwischen Milchwirtschaft und Schweinezucht in Dänemark konnte vom Verf. folgende Frage aufgestellt werden: Die erstklassige Qualität des dänischen Schweinefleisches beruht auf dem Milchfutter[1]); ist nun auch umgekehrt die erstklassige Qualität der dänischen Butter von der Schweinezucht irgendwie abhängig? Nach der Feststellung, daß die Schweine große Milchfresser in Dänemark sind, lag die Annahme nahe, daß die Schweinezucht und die Schweineställe auch Zentren der für die Milchwirtschaft so wichtigen Milchsäurebakterien seien. Von diesem Standpunkt aus ging Verf. an die nähere Bearbeitung der Frage.

Barthel (2) sagt folgendes: „Im Hinblick auf die außerordentliche Bedeutung, die die Milchsäurebakterien für die Milchwirtschaft und den Meiereibetrieb besitzen, ist es deutlich, daß alles, was im Zusammenhang mit der Biologie der Milchsäurebakterien steht, von Interesse ist, so gründlich wie möglich erörtert zu werden. Hierbei sind die Verhältnisse über das Vorkommen in der Natur und ihre eventuelle Abhängigkeit von anderen Mikroorganismen in besonders hohem Maße unserer Beachtung wert, weil sie geeignet sind, ein Licht auf die so wichtige Frage zu werfen, auf welche Weise die Bakterien in die Milch gelangen und welche Bedingungen zu ihrer Entwicklung in der Milch und den Meiereiprodukten vorhanden sind.“

Aus den obigen Ausführungen ergibt sich die Frage, ob die Schweinezucht in bakteriologischer Hinsicht für das Molkereiwesen von Bedeutung sein könnte und ob sie als „Infektionsquelle“ hinsichtlich der für Milch und Milchprodukte wichtigen Kleinlebewesen in Frage käme. Zur Beantwortung waren einmal Untersuchungen über das Vorkommen von Milchsäurebakterien im Schweinedarm und Schweinekot anzustellen, und ferner war zu prüfen, wie weit der Schweinestall und seine Umgebung als „Infektionsquelle“ für Milchsäurebakterien in Frage kommt. Letztere Untersuchungen wurden aus der Erwägung angestellt, ob im Falle der Anwesenheit von Milchsäurebakterien eine Übertragung hauptsächlich durch die Stalluft erfolgen kann. Um hier Klarheit zu schaffen, wurden zunächst Versuche über die Luftinfektion angestellt. Im Anschluß an diese Hauptuntersuchungen wurden vergleichende Versuche über das Vorkommen und die Arten der Milchsäurebakterien in Kot von Schwein, Kuh und Kalb einerseits, in Futtermilch, Molke und Säurewecker andererseits ausgeführt.

B. Historisches.

Nachdem Pasteur 1857 gezeigt hatte, daß die Milchgärung durch Mikroorganismen verursacht wird, sind umfassende Studien über die Milchsäuregärung vom mikrobiologischen Standpunkt gemacht worden, z. B. von Lister, Grotenfelt, Hueppe, Leichmann. Innerhalb der Milchbakteriologie interessierte natürlich u. a. die Frage, woher die die gewöhnlich Milchsäuregärung bewirkenden Laktokokken stammen.

[1]) Forsøqslaboratoriets 128 Beretning. København 1931.

Daß sie nicht schon im Euter in die Milch gelangen, wurde früh festgestellt. Die ersten mehr umfangreichen Untersuchungen über das Vorkommen von Laktokokken in der Außenwelt wurden von Barthel (1), Leichmann, Freudenreich und Esten angestellt. Sie fanden diese Bakterien u. a. in frischen und alten Exkrementen, im Darmkanal von Kühen und in der Stalluft. Es lag daher die auch von Weigmann (1) ausgesprochene Vermutung nahe, daß die Milch von Darmlaktokokken der Kühe infiziert wurde, und daß diese identisch sind mit den Laktokokken der spontanen Milchsäuregärung.

Die Systematik und Nomenklatur der Milchsäurebakterien ist sehr uneinheitlich. In vorliegender Arbeit wird hauptsächlich das in der Milchwirtschaft allgemein anerkannte System der Milchsäurebakterien von Orla-Jensen zugrunde gelegt werden. Orla-Jensen konnte feststellen, daß im Darm der Kühe das „gewöhnliche" Milchsäurebakterium Streptococcus lactis sich nicht entwickelt. Hier findet sich dagegen eine andere Streptokokkenart, welcher er den Namen Streptococcus bovis gab.

Streptococcus bovis unterscheidet sich von Streptococcus lactis u. a. dadurch, daß er bei niederen Temperaturen (unter 30° C) ein langsames Wachstum zeigt, was für die Milchwirtschaft wichtig war zu wissen. Weiterhin fand Orla-Jensen eine andere Streptokokkenart, der er den Namen Streptococcus faecium gab, welche auch ein relativ langsames Wachstum in Milch zeigt.

Streptococcus faecium soll bei Tieren der allgemeinste Streptococcus sein. Str. lactis wurde niemals als Bewohner des Kuh- und Kälberdarms gefunden; selbst als vorübergehender Passant fand er sich dort äußerst selten. Z. B. gelang es Baumann nur, 3 Lactis-Stämme aus 50 Faecesproben von verschiedenen Kühen und Kälbern zu isolieren, Voß nur einmal von 10 verschiedenen Kühen. Sach konnte niemals Str. lactis bei den von ihm untersuchten Kühen isolieren. Auch die Darmflora des Menschen ist wiederholt mit negativem Erfolg auf das Vorkommen von Str. lactis untersucht worden, z. B. von Henneberg (1). Orla-Jensen und Winther sagen, daß sogar bei Menschen, die täglich Sauermilch und Buttermilch trinken, äußerst selten Str. lactis und Str. cremoris in den Faeces zu finden sind. Außer Menschen und Kühen ist noch eine große Anzahl von Tieren, z. B. Hund, Hamster, Pferd usw. untersucht worden, aber Str. lactis fand sich auch bei diesen Tieren nicht in den Faeces.

Der Darmflora des Schweines hat man bisher sehr wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Nach unserer Kenntnis gibt es nur eine einzige Arbeit über dieses Gebiet, die von Heinick verfaßt und 1903 erschienen ist. Diese Arbeit, die nicht im Original zu erhalten war, jedoch von Schieblich (Mangold) referiert wurde, erweckt den Anschein, daß der Verf. des Originals auf die Milchsäurebakterien nicht näher eingegangen ist. Nach Schieblich (Mangold) soll auch Hopfe eine Arbeit über die Darmflora des Schweines angefertigt haben, die aber niemals veröffentlicht worden ist. Hopfe soll nach Schieblich im Dickdarm des Schweines Diplokokken gefunden haben. Es ist jedoch nicht angegeben, welcher Art die Diplokokken waren.

Teil I.

Faeces-, Darm- und Luftuntersuchungen.

C. I. Faeces- und Darmuntersuchungen.

1. Untersuchungsmethodik.

Faecesproben: Die Probenahme erfolgte sowohl bei Schweinen als auch bei Kühen mittels steriler Löffel stets in dem Augenblick des Kotabsetzens, wenn die Faecesproben das Rectum verließen. Die ersten Faeces-Anteile wurden zur Probenahme nicht verwendet. Zeitlich erfolgte die Probenahme wenige Stunden nach der Fütterung, wenn sich die Tiere gesättigt zur Ruhe gelegt hatten. Trieb man die Tiere hoch, so vergingen bis zur Darmentleerung nur wenige Minuten. Bei Ferkeln und Kälbern

wurde ein besonderes Instrument angewendet, mittels dessen die Faecesproben unmittelbar aus dem Darm entnommen werden konnten.

Darmproben: Unmittelbar nach dem Schlachten und Ausnehmen der Eingeweide wurden die Darmschlingen entwirrt und dezimetergroße Darmstückchen von verschiedenen Darmabschnitten nach vorherigem Abbinden auf beiden Enden herausgeschnitten.

Aus dem Schweinedarm wurden sowohl Milchsäurestreptokokken wie Milchsäurestäbchen (Thermobakterien) isoliert. Die Untersuchungen über Thermobakterien waren nur orientierender Art. Am meisten interessierten die Milchsäurestreptokokken im Darmkanal des Schweines.

Die Milchsäurestreptokokken aus Faeces und Darm wurden mit Hilfe der Plattenmethode isoliert. Im Verlaufe des ersten Teiles der Untersuchungen wurden Agarnährböden verschiedener Zusammensetzung auf ihre Brauchbarkeit geprüft, z. B. Traubenzucker- und Milchzuckeragar mit und ohne Chinablauzusatz, Kunzeagar, Milchagar und mehrere andere Substrate. Auch der Einfluß verschiedener p_H-Werte in diesen Nährböden wurde geprüft.

Unter den Agarnährböden erwiesen sich Traubenzucker- und Milchzuckeragar mit Chinablau als Indikator als die günstigsten. Auf diesen Platten ließ sich sofort feststellen, welche Kolonien säuerten, was die Isolierung der Milchsäurestreptokokken in hohem Maße erleichterte. Die Wasserstoffionenkonzentration der Nährböden spielte eine große Rolle bei dem Aufkommen der Milchsäurestreptokokken. Bei vorliegenden Untersuchungen wurde hauptsächlich Chinablau - Milchzuckeragar folgender Zusammensetzung angewendet:

100 ccm Fleischwasseragar (50 g kleingehacktes Fleisch, 100 ccm Wasser, 1 g Pepton, 0,5 g NaCl und 2—3% Agar) wurden 2 g Milchzucker (bzw. Traubenzucker) und 5 Tropfen einer gesättigten, wässerigen Chinablaulösung zugesetzt. Der Nährboden zeigte eine blaugrüne Farbtönung. Sterilisiert wurde er durch dreimaliges, je halbstündiges Erhitzen im Dampftopf.

Auf Traubenzuckeragar-Platten entwickelten sich die Milchsäurestreptokokken aus dem Darm im allgemeinen reichlicher als auf Milchzuckeragar. Trotzdem wurde zumeist Milchzuckeragar benutzt, weil in der Hauptsache solche Milchsäurebakterien interessierten, die ein gutes Milchzuckersäuerungsvermögen besaßen. Von Faeces- und Darmproben wurden sowohl „Direktplatten“ sowie auch Platten nach vorheriger Anreicherung in Milch angelegt: „Platten via Milch“.

Unter Direktplatten sind Agarplatten zu verstehen, die unmittelbar aus Kot- oder Darminhalt-Aufschwemmungen in sterilem Wasser mit Agar gegossen wurden. Überall dort, wo es darauf ankam, die genaue Keimzahl der in 1 g Faeces enthaltenen Milchsäurebakterien zu ermitteln, wurden Direktplatten mit verschiedenen, genau abgestuften Verdünnungen mit sterilem Wasser angelegt. Die „Platten via Milch“ wurden durch Übertragen einer Öse Faeces in sterile Milch angelegt. Ihre Herstellung geschah in der Weise, daß von jeder Faecesprobe mehrere Röhrchen mit steriler Milch beimpft und ein Teil der Röhrchen bei 30°, der andere Teil derselben bei Zimmertemperatur allgemein bis zur Gerinnung bebrütet wurde. Nach der Koagulation bzw. nach längerem Stehen wurde eine im Durchmesser etwa 1½ mm große Platinöse des Koagulums bzw. der Milch in Reagenzgläsern mit sterilem Wasser durchgeschüttelt. Von dieser Ausfchwemmung wurde abermals eine gleichgroße Öse in sterilen, verflüssigten Agar bei einer Temperatur von 48° übertragen und Platten gegossen. Mit der genannten Methode wurden stets gut bewachsene Platten erzielt, die weder zu dicht noch zu dünn besät waren. In einigen Fällen wurden an Stelle von Gußplatten vergleichsweise auch Ausstrichplatten angelegt. Sowohl durch Direktplatten wie durch Platten nach Anreicherung in Milch konnte eine große Zahl verschiedener Arten von Milchsäurestreptokokken isoliert werden.

Milchsäurestäbchen (Thermobakterien) wurden nach der Burrischen Methode oder mit Hilfe des Plattenkulturverfahrens im Vakum-Exsikkator auf anaerobem Wege gewonnen. Die Nährböden waren dabei dieselben wie bei der Isolierung von

Milchsäurestreptokokken; hauptsächlich wurde hier jedoch Kunzeagar[1]) verwendet. Zur Anlegung von Dauerkulturen wurden die isolierten Stämme in Magermilch mit Kreidezusatz geimpft und zweimal im Monat in die gleichen Nährböden übertragen. Die Stämme wurden teilweise längere Zeit in Milch aufgehoben, da es von Interesse war, festzustellen, ob ein längerer Aufenthalt in Milch von Einfluß auf die Eigenschaften der Stämme sein könnte. Besonders war bei solchen Stämmen, die nach ihrer Isolierung bei Zimmertemperatur in Milch nur langsam wuchsen, darauf zu achten, ob sie nach längerer Züchtung in Milch ihre Wachstumsgeschwindigkeit änderten. Bei der Isolierung von Milchsäurestreptokokken wurde unmittelbar von den Kolonien der Agarplatten in Milch bzw. Lackmusmilch geimpft. Die Dauerkulturen von Thermobakterien wurden in Maische mit Kreidezusatz angelegt. Die Stämme wurden vor weiteren Prüfungen mehrmals über Platten geschickt.

2. Vergleichende Untersuchungen über das Vorkommen von Milchsäurestreptokokken in Faeces von Schwein, Kuh und Kalb.

Um möglichst rasch eine Vorstellung darüber zu erhalten, ob Milchsäurestreptokokken im Schweinedarm zahlreicher vorkommen als im Kuhdarm und ob diese fernerhin eine größere Wachstumsgeschwindigkeit in Milch aufweisen als diejenigen aus dem Kuhdarm, wurden vergleichende Untersuchungen angestellt. Hierbei ging ich von der Erwägung aus, daß Darmmilchsäurebakterien vom Schwein für den Fall, daß ihnen eine größere Bedeutung für die Milchwirtschaft zukäme, entweder zahlreicher im Schweinedarm als im Kuhdarm vorkommen müßten oder eine größere Wachstumsgeschwindigkeit in Milch aufweisen oder aber, daß sie beide Voraussetzungen erfüllen müßten.

Für die vergleichenden orientierenden Untersuchungen wurden Faecesproben auf dem Versuchsgut in Friedrichsort bei Kiel genommen.

Auf dem Friedrichsorter Versuchsgut befanden sich 30 Kühe und über 100 Schweine verschiedenen Alters. Während der Untersuchungszeit wurden die Kühe mit Markstammkohl, Heu und Kraftfutter gefüttert. Die Schweine ließen sich hinsichtlich der Eiweißfütterung in zwei verschiedene Gruppen einteilen; die eine Gruppe erhielt als Eiweißnahrung dicksaure Magermilch, die andere Gruppe Fischmehl. Außerdem wurden an die Schweine verfüttert: gedämpfte Kartoffeln, Schrot und andere Futtermittel (die angestellten Fütterungsversuche dienten hauptsächlich zur Ermittlung der Gewichtszunahme). Die größte Menge der täglich verfütterten Sauermilch war 4 l pro Tier. Die Fütterung der Schweine mit Sauermilch ist in Dänemark und Norddeutschland (Schleswig-Holstein und Mecklenburg) verbreitet.

Auf dem Versuchsgut in Friedrichsort wurden im Dezember 1934 zum ersten Male Faecesproben von 4 Kühen und einem ca. 3 Monate alten Kalb genommen. Das Kalb erhielt außer anderem Futter pro Tag 8 l saure Milch. Außerdem wurden Faecesproben von 7 Schweinen genommen, von denen 5 im Alter von 4—6 Monaten und 2 im Alter von 2—3 Monaten standen. Sechs dieser Schweine wurden mit Sauermilch gefüttert, ein Schwein von 4—6 Monaten erhielt statt Sauermilch Fischmehl. Im darauffolgenden Monat Januar 1935, wurden ebenfalls Faecesproben von der gleichen Anzahl Kühe und Schweine, jedoch nicht von den gleichen Tieren genommen. Von allen Faecesproben wurden sowohl Direktplatten als auch Platten nach Anreicherung in Milch gegossen („Platten via Milch").

a) Der Einfluß von Schweine- und Kuhfaeces auf sterile Milch.

Wenn sterile Milch mit Schweinekot beimpft wurde, so koagulierte sie im allgemeinen nach 24 Std. bei 30° C oft ohne oder unter sehr geringer Gas-

[1]) Kunzeagar (Molken-Pepton-Agar).

bildung. Auch bei Zimmertemperatur wurde Milch, die in Röhrchen mit Schweinekot geimpft war, meistens schnell „dickgelegt". Röhrchen, die mit Kuhkot beimpft waren, koagulierten im allgemeinen nach ungefähr 48 Std. bei 30° C unter reichlicher Gasbildung. Die Tab. A zeigt den Wachstumsbefund in Milchröhrchen, die mit Kuh-, Kalb- und Schweinefaeces im Dezember beimpft waren, nach der Milchkoagulation.

Tabelle A.

	Nr.	Milch mit einer Öse Faeces beimpft	
		Nach 24 Std. 30°	Nach 48 Std. 30°
Schweine 2 Monate	1	gleichmäßiges, geleeartiges Koagulum	—
2 „	2	wie Nr. 1	—
4—6 „	3	koaguliert, mit kleinen Rissen	—
4—6 „	4	wie Nr. 3	—
4—6 „	5	schön koaguliert, kleine Gasblasen	—
4—6 „	6	gleichmäßiges, geleeartiges Koagulum	—
4—6 „	7	stark zorrissenes Koagulum	—
Kuh	1	Milch unverändert	koaguliert, stark zerrissenes Koagulum
„	2	wie Nr. 1	wie Nr. 1
„	3	wie Nr. 1	wie Nr. 1
„	4	wie Nr. 1	wie Nr. 1
Kalb	5	koaguliert, stark zerrissenes Koagulum	—

Nach der Dicklegung der Milchröhrchen durch die Facesproben wurden Ausstrichpräparate nach Gram angelegt. Diese ergaben, daß die mit Schweinefaeces beimpfte Milch stark mit grampositiven Strepto- und Diplokokken angereichert war. Außerdem traten oft Hefen und Schimmelpilze, besonders Oospora lactis auf. Ließ man die Röhrchen nach der Koagulation noch einige Zeit stehen, so entwickelten sich oft Hefen in der geronnenen Milch. Betreffs der mit Kuh- oder Kalbfaeces beimpften Milchröhrchen ließ sich nach der Koagulation im Grampräparat feststellen, daß die Milchröhrchen mit gramnegativen Coli-Aerogenes-Bakterien angereichert waren.

Bei Untersuchungen der Darmflora des Rindes kam Stahl zu gleichem Ergebnis. Nach Durchsicht einer größeren Anzahl von Arbeiten aus der Literatur gewann Stahl die Überzeugung, daß man nicht alle Darmstreptokokken durch das direkte Plattenverfahren zu erfassen vermag. Er versuchte u. a. die Milchsäurebakterien aus Kuhkot durch Anreichern in Milch zu erfassen. Der Erfolg geht aus folgendem Ausspruch Stahls hervor: „Auffallen mußte bei der Art der Gerinnung, daß das Koagulum so häufig gänzlich zerrissen oder mit Gasspalten und Löchern durchsetzt war. Das erweckt die begründete Annahme, daß die gasbildenden Säuerungsbakterien von den gewöhnlichen Milchsäurebakterien in ihrer Entwicklung nicht gehindert werden können."

b) „Platten via Milch."

Auf allen Aerobenplatten, die nach Anreicherung in Milch von Faecesproben der mit Sauermilch gefütterten Schweine angelegt waren, herrschte eine mehr oder minder große Zahl stark säuernder Milchsäurebakterien vor,

deren Kolonien nach 48 Std. bei 30° C die Größe eines Stecknadelkopfes hatten. In mehreren Fällen kam es vor, daß die Platten 90—100% dieser Milchsäurebakterien-Kolonien aufwiesen. Aerobenplatten, die „via Milch" mit Faeces von nicht mit Sauermilch gefütterten Schweinen beimpft waren, wiesen ebenfalls eine verhältnismäßig große Zahl Milchsäurebakterien auf, welche jedoch nicht Milch so kräftig säuerten. Auf Platten, die mit Kuh- und Kalbfaeces nach Anreicherung in Milch geimpft waren, befanden sich keine echten Milchsäurebakterien, sondern vorwiegend Coli-Aerogenes- neben nichtsäuernden Kolonien; die letzteren waren in der Minderheit. Um aus Kuhfaeces Milchsäurebakterien in Milch anzureichern, war es notwendig, der Milch Säure (0,20% Milchsäure) hinzuzusetzen.

c) Direktplatten.

Direktplatten von Schweinefaeces waren im allgemeinen reichlich mit Milchsäurebakterien besät, jedoch waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben oft groß. Auf aeroben Direktplatten von Kuh- und Kalbfaeces waren Milchsäurebakterien an Zahl wesentlich geringer.

Berechnet auf 1 g Faeces schwankte die Zahl der Milchsäurebakterien beim Schwein zwischen mehreren Milliarden und einigen Zehntausend, bei Kuh- und Kalb dagegen betrug sie nur einige Tausend. Hervorgehoben werden muß jedoch, daß der als Nährboden benutzte Milchzucker-Chinablau-Agar für Kuhfaeces-Milchsäurebakterien vielleicht nicht so günstig war, wie es u. U. Traubenzuckeragar gewesen wäre. Aber wie früher betont, wurde hauptsächlich Milchzuckeragar angewandt, da hier vor allem die Milchzucker gut säuernden Arten interessierten. Gleichzeitig muß darauf hingewiesen werden, daß in den mit Kuhfaeces beimpften Milchproben Milchsäurebakterien niemals zur Vorherrschaft gelangten und sich auch gegenüber den übrigen Bakterien nicht durchsetzen konnten. Dies deutet darauf hin, daß die Milchsäure-Streptokokken des Kuhdarmes für die Milchwirtschaft in ihrer Bedeutung nicht überschätzt werden dürfen.

Direktplatten wurden nach dem Beimpfen zunächst 1—2 Tage bei 30° C bebrütet und noch einige Tage bei Zimmertemperatur gehalten. Dadurch wurde verhütet, daß sich andere Mikroorganismen zu schnell vermehrten und die echten Milchsäurebakterien überwucherten, wodurch das Abimpfen der Milchsäurebakterien erschwert worden wäre.

Sowohl von Direktplatten wie von „Platten via Milch" wurde eine größere Anzahl Milchsäurebakterien isoliert und in Magermilch- und Lackmusmilchröhrchen übergeimpft.

d) Vergleichende Untersuchung der isolierten Streptokokkenstämme.

Die isolierten Stämme wurden bei den vergleichenden Massenuntersuchungen auf Morphologie, Verhalten in Lackmusmilch, Temperatur-Optima und -Maxima sowie auf Hitzeresistenz geprüft. Nach den Ergebnissen der erwähnten Proben konnten sie in vier Gruppen eingeteilt werden. Die I. Gruppe zeichnete sich beim Wachstum in Lackmusmilch durch die von Heim (1 a) angegebenen Eigenschaften aus (siehe bakteriologischen Teil). Gutes Wachstum bei Zimmertemperatur, Koagulation nach 1—3 Tagen. Bei 37° C variiert die Koagulationszeit zwischen 1—2 Tagen und darüber (im allgemeinen nach 24 Std.). Bei 45° C lag kein oder nur sehr geringes

Wachstum vor. Die Stämme waren nicht hitzeresistent mit seltenen Ausnahmen, die 60° C eine halbe Stunde vertrugen.

Die Stämme der Gruppe II ergaben eine Lackmusmilchprobe nach Heim (2 a): Die optimale Temperatur dieser Stämme lag in der Nähe von 37° C. Auch bei 45° C fand noch gutes Wachstum statt und bei gleicher Temperatur oft auch noch nach 24 Std. eine Koagulation. Bei 30° koagulierten die Stämme sterile Magermilch im Verlaufe von 2—5 Tagen. Bei 20° war das Wachstum in Magermilch gering oder aber nicht nachweisbar. Sie waren nicht hitzeresistent.

Die Gruppe III zeigt folgende Eigenschaften: Lackmusmilchprobe Heim (2 a) oder Heim (3 a): Temperaturoptimum 37°; bei 45° relativ gutes Wachstum. Bei Zimmertemperatur Koagulation nach ca. 14 Tagen und darüber. Das Koagulum war bei 30° lose und von unappetitlichem Aussehen. Alle Stämme waren hitzeresistent; die meisten vertrugen noch eine $^1/_4$stünd. Erhitzung von 70°.

Stämme der Gruppe IV, die nicht Milch koagulierten, ergaben eine Lackmusmilchprobe Heim (3 c). Diese Stämme wurden nur in Lackmusmilch geprüft, da sie bei den vorliegenden Untersuchungen von weniger Interesse waren.

Beim Studium der morphologischen Verhältnisse an Farbausstrichen und z. T. Federstrichkulturen nach Lindner konnten keine Verschiedenheiten zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Die hierzu gehörenden Stämme wuchsen entweder in kürzeren Ketten, in Diplokokken oder in beiden Formen. Ausnahmsweise konnten auch längere Ketten beobachtet werden.

e) Das Vorkommen der drei verschiedenen Streptokokkengruppen.

Stämme der Gruppe I konnten in unbegrenzter Zahl von „Platten via Milch“ aus Faeces von Schweinen, die mit Sauermilch gefüttert waren, isoliert werden. Einzelne Stämme konnten auch von den Direktplatten aus den Faeces der erwähnten Schweine isoliert werden. Aus Faeces von Kuh und Kalb konnten weder auf Direktplatten noch auf „Platten via Milch“ Stämme dieser Gruppe gezüchtet werden, ebensowenig aus Faeces von Schweinen, die mit Fischmehl anstatt mit Sauermilch gefüttert waren.

Stämme, die zu den Gruppen II und III gehören, konnten sowohl aus Faecesproben von Schweinen als auch von Kuh und Kalb isoliert werden.

Nach Abschluß der vorbereitenden Untersuchungen ergab sich die Frage, zu welcher Gattung die drei Bakteriengruppen zu rechnen seien. Orla-Jensen (1) verwendet in seinem System der Milchsäurebakterien für die Einteilung der verschiedenen Arten unter anderem das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen, Bestimmung des Temperaturmaximums, -optimums, -minimums, der Hitzeresistenz sowie der morphologischen Eigenschaften. Auf Grund des Ergebnisses dieser Proben lag es nahe, die Bakterien der Gruppe I der Spezies des Str. lactis, die Bakterien der Gruppe II zur Spezies des Str. bovis und die Bakterien der Gruppe III zum Str. faecium (Orla-Jensen) hinzuzurechnen.

Stämme, die zur Gruppe I gehören, ergaben innerhalb von 7—20 Std. eine Lackmusmilchprobe nach Heim (1 a). Auch dieses Ergebnis deutete

darauf hin, daß Str. lactis, das „gewöhnliche“ Milchsäurebakterium, vorlag. Heim (1), der eine große Anzahl Milchsäurebakterien in Lackmusmilch geprüft hat, vertritt die Meinung, daß das Ergebnis Heim (1 a) ein spezifisches Merkmal des Str. lactis darstellt. Den verschiedenen Ergebnissen der Heimschen Lackmusmilchproben hat man verschiedene Bezeichnungen gegeben; so wird das Ergebnis Heim (1 a u. 1 b) „typisch“, Heim (2 a) als „pseudotypisch“ (Demeter [1]), Heim (3 c) als „negativ“ bezeichnet. Indessen soll schon an dieser Stelle vorausgeschickt werden, daß in vorliegender Arbeit nur zwei Bezeichnungen angewandt wurden. „Typisch“ für Probe Heim (1 a) und „atypisch“ für alle übrigen Ergebnisse (siehe weiter Teil II: Systematische Untersuchungen).

Von 10 Str. lactis-Stämmen, die aus Schweinefaeces via Milch gezüchtet waren, wurden in Milch geimpft und nach der Koagulation (nach 24—48 Std.) Geruchs- und Geschmacksproben ausgeführt. Alle Stämme bis auf einen, verursachten einen rein säuerlichen, z. T. aromatischen Geschmack.

Aus den vergleichenden Untersuchungen geht folgendes hervor:

Milchsäurestreptokokken finden sich im Schweinefaeces in sehr viel größerer Menge als in Faeces von Kuh und Kalb. Die Milchsäurestreptokokken aus Schweinefaeces zeigen eine größere Entwicklungsgeschwindigkeit in Milch als diejenigen aus Faeces von Kuh und Kalb. Milch, mit Schweinefaeces beimpft, koagulierte oft innerhalb 24 Std. bei 30° durch grampositive Milchsäurestreptokokken, während Milch, die mit Kuhfaeces beimpft war, im allgemeinen erst nach 48 Std. bei 30° unter kräftiger Gasbildung und zwar durch gramnegative Coli-aerogenes-Bakterien koagulierte.

Str. lactis (Gruppe I) konnte aus den Faecesproben der mit Sauermilch gefütterten Schweine nach vorheriger Anreicherung in Milch in sehr großer Zahl isoliert werden. Hingegen ließen sich mit Hilfe der „Direktplatten“ aus den gleichen Faecesproben nur wenige Stämme der gleichen Art gewinnen. Str. lactis-Stämme aus Schweinen bildeten in Milch einen aromatischen mild säuerlichen Geschmack. Die Feststellung, daß Milchsäurestreptokokken sich im Schweinedarm reichlich entwickeln, ist von Interesse, weil sie die Vermutung stützt, daß die Schweinezucht in bakteriologischer Hinsicht von Einfluß auf die Milchbeschaffenheit sein kann.

Von großem Interesse war die Feststellung, daß im Darm von Schweinen, die mit Sauermilch gefüttert waren, ein Milchsäurestreptokokkus verbreitet war, der sich in Milch auch bei gewöhnlicher Zimmertemperatur (ca. 20°) sehr gut entwickelte, und welcher in seinen Eigenschaften große Ähnlichkeit mit dem Str. lactis zeigte.

Es ist klar, daß einem Mikroorganismus um so größere Bedeutung für die Milchwirtschaft zugemessen werden muß, je schneller er bei Temperaturen unterhalb der Körpertemperatur (30—20° und darunter) in Milch zu wachsen vermag. Auch wenn die folgenden Versuche zeigen sollten, daß Str. lactis (Gruppe I) nur ein aus der Futtermilch stammender Passant des Schweinedarms und identisch mit dem gewöhnlich in Milch vorkommenden Str. lactis wäre, so würde diese Feststellung von Bedeutung sein.

C. II. Ist Str. lactis nur ein vorübergehender Passant im Schweinedarm?

1. Fütterungsversuche zur Ermittlung der Darmflora.

a) Fütterungsversuche 1.

Zur Beantwortung der Frage, ob Str. lactis im Schweinedarm nur als Passant aufzufassen ist oder als Dauerbewohner sich dort anzusiedeln vermag, wurden verschiedene Fütterungsversuche durchgeführt.

Dank der freundlichen Vermittlung von Herrn Prof. Dr. Henneberg und dem liebenswürdigen Entgegenkommen des Direktors des Instituts für Milcherzeugung, Herrn Prof. Bünger, wurden vom Versuchsgut in Friedrichsort 4 Schweine zu Fütterungsversuchen zur Verfügung gestellt. Ein Schwein war 2—3 Monate, die übrigen drei 5 und 6 Monate alt. Bis zu Beginn des Versuchs waren sie mit gedämpften Kartoffeln, Schrot und je 3—4 l geronnener Magermilch pro Tag gefüttert worden. Die Versuchsschweine wurden nach Fütterungsgesichtspunkten in zwei Klassen, in die Klassen A und B, eingeteilt. Die Schweine der Fütterungsklasse A, welcher die älteren Tiere zugeteilt waren, erhielten statt Magermilch Fischmehl. Der Fütterungsklasse B wurde das 3 Monate alte Schwein zugeteilt; dieses Tier erhielt statt Sauermilch frische Magermilch, die stets kurz vor der Verfütterung aufgekocht und dann gekühlt war. Mit solcher Milch wurde zweimal am Tage gefuttert. Im übrigen wurde die frühere Fütterungsweise mit frisch gedämpften Kartoffeln und Schrot beibehalten. Der Zweck der vorgenommenen Fütterungsänderungen war im Falle der Versuchsklasse A (Fischmehl anstatt Sauermilch) festzustellen, ob Str. lactis sich nach Aufhören der Milchfütterung noch einige Zeit würde im Darm halten können. Im zweiten Falle, Fütterungsklasse B (gekochte Milch), sollte herausgefunden werden, ob Str. lactis nur als vorübergehender Passant oder als Dauerbewohner im Darm aufzufassen wäre. Durch das Aufkochen der Milch unmittelbar vor der Fütterung wurden die evtl. in der Milch vorhandenen Milchsäurestreptokokken mit großer Sicherheit abgetötet. Dadurch wurde die Zufuhr von Milchsäurestreptokokken von außen her unterbunden. Sollte es sich ergeben, daß trotzdem Str. lactis in den Faeces dieses Tieres auftraten, so mußte dies darauf schließen lassen, daß er sich im Darm angesiedelt hatte. Da das Ergebnis der Fütterungsversuche der Klasse B sehr wichtig für die sich daraus ergebenden Schlußfolgerungen war, wurde dieses Tier in einem Verschlag von den übrigen Schweinen gesondert gehalten. Die Milch wurde dem Schwein in einem Topf vorgesetzt, der sofort nach der Fütterung wieder aus dem Verschlag herausgenommen und vor jeder Fütterung sorgfältig gereinigt wurde.

Von allen 4 Versuchsschweinen wurden vor der Änderung der Fütterungsweise Faecesproben genommen zum Zwecke der Feststellung, ob Str. lactis im Darm der Tiere vorhanden war. Auf allen Platten via Milch waren reichlich Milchsäurestreptokokken der Gruppe I (Str. lactis) gewachsen, und zwar bei allen 4 Schweinen.

Während der Fütterungsversuche, die für die Fütterungsklasse A 8 Tage und Klasse B 12 Tage dauerten, wurden je zweimal Faecesproben entnommen, und zwar von den Schweinen der Fütterungsklasse A nach 4 und 8 Tagen, von dem Schwein der Fütterungsklasse B nach 4 und 12 Tagen, vom Tage der Fütterungsänderung an gerechnet. Von allen Faecesproben wurden sowohl direkt als auch nach Anreicherung in Milch Platten angelegt.

In Fütterungsklasse B bekam das Tier bei Übergang von Sauermilch zu gekochter Magermilch Durchfall. Der Durchfall dauerte mehrere Tage.

Bei der ersten Probeentnahme am 4. Tage nach Fütterungsänderung konnten überhaupt keine Milchsäurestreptokokken isoliert werden, weder nach Anreicherung der Faecesbakterien in Milch noch auf Direktplatten. Dagegen waren die Platten reichlich mit Coli und anderen Mikroorganismen bewachsen. Bei der zweiten Probeentnahme nach 12 Tagen dagegen, nachdem die Faeces wieder normal geworden waren, wurden reichlich Milchsäurestreptokokkenkolonien sowohl auf den Direktplatten als auch auf den Platten

via Milch vorgefunden. Besonders reichlich traten kräftig säuernde Streptokokken auf bei Gußplatten, die mit Material aus beimpften und bei Zimmertemperatur bebrüteten Milchkulturen beschickt waren.

Bei den mit Fischmehl gefütterten Schweinen traten ebenfalls verhältnismäßig reichlich kräftig säuernde Streptokokken sowohl auf den Direktplatten als auch auf den Platten von Milch auf.

Die Ursache des Auftretens von Durchfall bei dem einzigen Schwein der Futterklasse B konnte nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden; es ist jedoch anzunehmen, daß der Durchfall durch die gekochte Milch verursacht wurde. Glet, der bei mehreren Schweinen Fütterungsversuche mit Rohmilch und pasteurisierter Milch vorgenommen hatte, um Knochenbildung und Zuwachs zu untersuchen, stellte fest, daß Schweine bei Fütterung mit pasteurisierter Milch Durchfall bekommen, welcher nach einigen Tagen wieder vorübergeht. Glet sagt: „Die erhitzte Milch bekam den Tieren . . . zunächst nicht. Durchfall stellte sich ein. Von der zweiten Versuchswoche ab hatten sich die Tiere an erhitzte Milch gewöhnt . . .“

Eine große Anzahl von Stämmen, die von Direktplatten und via Milch isoliert waren, wurden morphologisch und physiologisch untersucht.

Tab. 1 (Bakteriologischer Teil) zeigt eine Reihe von Streptokokkenstämmen aus Faeces von Schweinen, die mit Sauermilch gefüttert waren.

Tab. 2 zeigt Stämme aus Faeces von Schweinen der Fütterungsklasse B nach 12tägiger Fütterung mit Magermilch. Diese Stämme sind sämtlich von den Platten nach vorheriger Anreicherung in Milch abgeimpft worden.

Tab. 3 betrifft Stämme aus Faeces von Schweinen der Fütterungsklasse A nach 8tägiger Fütterung mit Fischmehl. Die Stämme wurden isoliert von Platten via Milch.

Tab. 4 betrifft Stämme derselben Fütterungsklasse A, die von Direktplatten isoliert wurden.

Wenn man die Stämme der Tab. 2, 3 und 4, die sämtlich von Schweinen mindestens 8 Tage lang nach der Änderung der Fütterung isoliert waren, miteinander vergleicht, so findet man, daß jede Tabelle mit wenigen Ausnahmen in Tab. 3 und 4 ihre besonderen Arten aufweist. Die Stämme der Tab. 2 verhalten sich betreffs Hitzeresistenz, Wachstum bei verschiedenen Temperaturen und Lackmusmilchprobe wie Milchsäurestreptokokken, die zu Gruppe I (Str. lactis, s. vergleichende Untersuchungen) gehören. Die Stämme der Tab. 3 mit Ausnahme der Stämme 21, 27 und 29 verhalten sich wie Milchsäurestreptokokken der Gruppe II (Str. bovis) hinsichtlich der genannten Eigenschaften. Die Stämme der Tab. 4 verhalten sich wie die Milchsäurestreptokokken der Gruppe III (Str. faecium) mit Ausnahme der Stämme 40, 43 und 44, welche zusammen mit den vorher genannten Stämmen 21, 27 und 29 in Tab. 3 zur Gruppe I gehören.

Die Erklärung dafür, daß die Stämme sich auf die genannten Tabellen aufteilten, dürfte ziemlich nahe liegen. Daß die Stämme der Gruppe I (Str. lactis) auf Platten via Milch aus dem Schwein, das mit gekochter Milch gefüttert war, isoliert werden konnten, beruht auf dem großen Entwicklungsvermögen dieser Stämme in Milch und zeigt, daß diese Streptokokkenart nicht als vorübergehender Passant des Schweinedarms, sondern als ein Dauerbewohner desselben zu betrachten ist, wenn das Schwein mit Milch gefüttert wird. Daß einzelne zur Gruppe I gehörige Stämme von solchen Schweinen isoliert werden konnten, die 8 Tage mit Fischmehl statt Sauermilch gefüttert waren, zeigt, daß diese Stämme nach

der Fütterungsänderung erst allmählich in der Darmflora zurücktraten und verschwanden.

Daß zur Gruppe II (Str. bovis) gehörige Stämme vorzugsweise auf Platten via Milch aus Schweinen, die erst eine Woche mit Fischmehl gefüttert waren, isoliert wurden, kann darauf zurückgeführt werden, daß diese Stämme wahrscheinlich reichlich im Darm dieses Schweines angesiedelt waren und daß die Entwicklungsgeschwindigkeit in Milch bei höheren Temperaturen auch gut war, besser als für Gruppe III (Str. faecium).

Daß die Stämme der Gruppe III (Str. faecium) hauptsächlich von Direktplatten isoliert wurden, mag darauf zurückzuführen sein, daß die Platten nur 1 bis 2 Tage im Brutschrank bei 30° C und mehrere Tage bei Zimmertemperatur bebrütet waren, wodurch günstigere Wachstumsmöglichkeiten für Str. faecium als für Str. bovis vorlagen. Vielleicht kann die Art der Eingruppierung auch darauf beruhen, daß auf den Platten hauptsächlich nach den stark säuernden Kolonien gesucht wurde.

b) Fütterungsversuche 2.

Bei den vorhergehenden Fütterungsversuchen wurde festgestellt, daß Str. lactis sich im Darm des Schweines ansiedeln konnte, wenn das Schwein Milchfutter erhielt. Um eine Bestätigung des interessanten Ergebnisses zu erhalten, wurden noch einmal Fütterungsversuche ausgeführt. Ein 3½ Monate altes Schwein, das vorher mit Sauermilch (3 l je Tag) gedämpften Kartoffeln und Schrot gefüttert war, wurde in dem Verschlag eines Pferdestalles auf dem Versuchsgut in Friedrichsort isoliert. Hier erhielt es 8 Tage lang keine Milch, sondern Fischmehl als Eiweißfutter. Dann wurde es mit 4—5 l frisch gekochter Magermilch pro Tag gefüttert.

Wie bei vorhergehendem Fütterungsversuch (A) konstatiert wurde, konnten einzelne Stämme der Gruppe I (Str. lactis) von Schweinen isoliert werden, die über eine Woche anstatt saurer Magermilch Fischmehl erhalten hatten. Der Zweck dieser Fütterung war festzustellen, ob Str. lactis evtl. nach einer Woche Fischmehlfütterung noch im Darm vorhanden war und sich wieder anreichern konnte, sobald das Schwein wieder Milchfutter (gekocht) erhielt.

Vor Beginn der Neufütterung mit Fischmehl wurde untersucht, ob Milchsäurestreptokokken der Gruppe I (Str. lactis) sich im Darm befanden. Stämme dieser Gruppe konnten in unbegrenzter Menge von Platten via Milch isoliert werden. Während der ersten 8 Tage der Fischmehlfütterung waren die Faeces des Schweines von normaler Konsistenz. Dagegen bekam das Schwein unmittelbar nach der Fütterung mit gekochter Milch einen heftigen Durchfall, der sich über mehrere Tage erstreckte. Aus der Faecesprobe, die nach 8tägiger Fischmehl- und anschließender 8tägiger Fütterung mit gekochter Milch entnommen wurde, konnten keine zur Gruppe I gehörigen Milchsäurestreptokokken isoliert werden. Nachdem aber eine zweite Woche mit gekochter Magermilch gefüttert war, traten auf den Platten via Milch reichlich Kolonien der Gruppe I (Str. lactis) auf; sogar von den Direktplatten konnten einige zu dieser Gruppe gehörige Stämme isoliert werden.

2. Darmuntersuchungen

a) an einem Schwein aus dem Versuchsgut.

Nach den letzten Faecesuntersuchungen des Fütterungsversuches 2 wurde das isolierte Schwein noch 2 Wochen mit gekochter Magermilch ge-

füttert. Danach wurden von ihm nach Schlachtung frische Darmproben entnommen. Nicht weniger als 9 verschiedene Darmproben wurden nach früher angegebener Methode herausgeschnitten, und zwar 4 Proben von verschiedenen Teilen des Dünndarms, eine Probe vom Zwölffingerdarm, eine Probe vom Blinddarm, zwei vom Dickdarm und eine vom Mastdarm.

Der Darminhalt der ersten Probe, vom Magen aus gerechnet, hatte folgendes Aussehen:

Dünndarm 1: wässeriges, grüngelbes Aussehen (von Galle),
,, 2: gleiche Beschaffenheit wie 1,
,, 3: gleiche Beschaffenheit wie 1,
,, 4: von grüngelber dickerer Konsistenz.
Zwölffingerdarm 5: geringer, aber sehr schleimiger Inhalt.
Blinddarm 6: grütziger Inhalt mit vielen kleinen Steinen. Länge des Blinddarms betrug ca. 2 dm.
Dickdarm 7: grüngelblicher, relativ wässeriger Inhalt.
Dickdarm 8: grünlicher Inhalt mit mehreren festen Teilchen.
Mastdarm 9: von normaler Konsistenz und grüngrauer Farbe.

Die Direktplatten vom Dünndarm waren im Vergleich zu den Direktplatten vom Blinddarm, Dickdarm und Mastdarm sehr wenig mit Kolonien besät. Was die Platten der verschiedenen Dünndarmproben betrifft, so nahm die Zahl der Kolonien mit dem Abstand vom Magen zu. Die Platten der beiden ersten dem Magen am nächsten liegenden Proben wiesen sehr wenig Kolonien auf, die aus Kokken (nicht Milchsäurestreptokokken), Sarcinen und Sporenbildnern bestanden. Wirklich reichlich wurde erst die Zahl der Kolonien vom Blinddarm ab. Ihren Höhepunkt erreichte die Zahl der Kolonien im Blinddarm und Dickdarm. Erst auf den Platten der näher am Blinddarm entnommenen Dünndarmproben traten vereinzelt Kolonien von Milchsäurestreptokokken auf. Diese entwickelten sich in Milch sehr langsam und zeigten in ihrem Verhalten die größte Ähnlichkeit mit Str. faecium. Die verhältnismäßig größte allgemeine Keimzahl trat auf den Platten der Dünndarmproben die dem Blinddarm am nächsten lagen, auf, und zwar vorwiegend Bakterien der Coli-aerogenes-Gruppe.

Die Direktplatten vom Blinddarm und Dickdarm enthielten zum größten Teil zur Coli-aerogenes-Gruppe gehörende Kolonien. Auf diesen Platten traten jedoch auch reichlich Milchsäurestreptokokken-Kolonien auf.

Es muß hier hervorgehoben werden, daß das Versuchsschwein am Tage vor der Schlachtung noch einmal Durchfall bekommen hatte, was den Eindruck erweckte, daß dieses Schwein sich an gekochte Milch nicht richtig gewöhnen konnte. Da jedoch alle Vorbereitungen für das Schlachten schon getroffen waren, konnte ein Aufschub nicht mehr erfolgen.

Von Direktplatten wurde ein großer Teil Milchsäurestreptokokken-Kolonien in Lackmusmilch abgeimpft. Die allermeisten dieser Stämme hatten eine optimale Temperatur von 37°. Acht zur Gruppe I gehörige Stämme wurden von Direktplatten isoliert. Von diesen 8 Stämmen wuchsen 4 Stämme auf einer Platte der Blinddarmprobe, die übrigen 4 Stämme wurden auf verschiedenen Platten vom Dickdarm isoliert.

Die ;„Platten via Milch“ aus dem Dünndarm des geschlachteten Versuchsschweines wiesen keine Milchsäurestreptokokken der Gruppe I auf. Auf denen von Blinddarm, Dickdarm und Enddarm dagegen traten reichlich Streptokokken der Gruppe I in Erscheinung, besonders auf Platten von solcher Milch, die nach der Beimpfung bei Zimmertemperatur gestanden hatte. Auf diesen Platten waren 50—90% aller Kolonien Streptokokken der Gruppe I. Die Stämme 50 bis einschließlich 56 wurden auf „Platten via Milch“, Stämme 57—62 auf Direktplatten isoliert (Tabelle 5).

Folgende Übersicht zeigt das Aussehen von Milchproben, die mit Darminhalt beimpft und bei 30° bebrütet wurden.

Dünndarm 1: dunkelgelbes, schleimiges Koagulum.
„ 2: koaguliert unter kräftiger Gasbildung.
„ 3: wie Dünndarm 2.
„ 4: vollständig zerrissenes und geschrumpftes Koagulum, viel Gas.
Blinddarm 6: koaguliert mit wenig Gasblasen.
Dickdarm 7: schön koaguliert mit kleinen Rissen.
Dickdarm 8: koaguliert, wenig Gasblasen.
Enddarm 9: koaguliert, Gasbildung.

In den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Röhrchen war die Milch schön geronnen, soweit sie mit Blinddarm-, Dickdarm- und Enddarmproben beimpft waren, in den mit Dünndarmproben beimpften Röhrchen war sie überhaupt nicht dickgelegt.

b) Darmuntersuchungen an mehreren Schweinen aus dem Kieler Stadtschlachthof.

Von 4 Schweinen wurden Proben von Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm genommen. Nur aus einem Schwein konnten mit Leichtigkeit Milchsäurestreptokokken der Gruppe I, aus den 3 übrigen Schweinen nur andere Streptokokken isoliert werden. Es ist das wohl darauf zurückzuführen, daß die letzteren (Mastschweine von mindestens 300 Pfd. Lebendgewicht) überhaupt kein Milchfutter erhalten hatten.

Nach dem Darminhalt zu urteilen, waren diese Schweine mit grobem Futter (Grünfutter) ernährt worden, wie es im Hochsommer üblich ist. Es sei daran erinnert, daß in Deutschland selbst große Schweinezüchtereien oft ohne Milchfütterung mästen.

3. Untersuchungen der Faeces von Saugferkeln.

Da Streptokokken der Gruppe I (Str. lactis) ohne Schwierigkeit von Schweinen, die mit Kuhmilch gefüttert waren, isoliert werden konnten, lag die Vermutung nahe, daß auch im Darm von Saugferkeln Str. lactis vorhanden sei. Mit Rücksicht hierauf wurden Faecesproben von 4 Ferkeln, deren einziges Futter Muttermilch war, entnommen. Das Mutterschwein erhielt außer gedämpften Kartoffeln 4 l Sauermilch pro Tag. Stämme, die zur Gruppe I gehören, konnten nicht aus den Faecesproben der 4 Ferkel isoliert werden.

4. Das Vorkommen von Bakterien der Gruppe I (Str. lactis) in Schweinefaeces.

Str. lactis konnte also sehr leicht von Schweinen, die mit Milch gefüttert waren, auf Platten via Milch isoliert werden, jedoch nur wenig auf Direktplatten. Die Frage, in welcher Häufigkeit die Streptokokken der Gruppe I im Darm vorkamen, wurde bei den vergleichenden Untersuchungen als zweite Frage gestellt. Beruht dies darauf, daß die Streptokokken dieser Gruppe auf den Direktplatten nicht anzuwachsen vermögen oder darauf, daß sie nur in geringer Zahl im Darm vorkommen?

Voß fand, daß es schwer sei, Milchstreptokokken aus Darminhalt von Kühen auf Direktplatten zu isolieren, und er meint, die Ursache hierfür darin zu sehen, daß diese Arten infolge mangelnder Anpassung an das Nährsubstrat auf den Platten schlecht anwachsen können. Er meint weiter, dies sei ein Anhaltspunkt dafür, daß man auch früher wenig Milchsäurestreptokokken aus Darminhalt von Kühen isolieren konnte. Voß hat dafür (durch Anreicherungsverfahren) Milchsäurebakterien aus Faeces und Darminhalt von Kühen isoliert, bei dem er Peptonmilch und Milchsäurezusatz angewandt hat.

Daß es schwer ist, Milchsäurebakterien aus Faeces von Kühen auf Direktplatten zu isolieren, kann bestätigt werden. Dagegen war dies nicht der Fall bei Direktplatten von Schweinefaeces; hier traten im allgemeinen reichlich Milchsäurebakterien auf. Die Frage 2, ob die Streptokokken sich nicht auf Direktplatten ansiedeln konnten, galt hier bezüglich Gruppe I (Str. lactis). Die Beantwortung der Frage, in welchem Maße Streptokokken der Gruppe I im Schweinedarm vorkamen, war ziemlich schwierig. Nach Abschluß der Laboratoriumsarbeiten tauchte der Gedanke auf, sie könnte durch eine bei den Luftuntersuchungen benutzte Methode, die hier als „Röhrchenmethode" bezeichnet werden soll, gelöst werden. Hierfür wurde eine neue Faecesprobe von einem Schwein des Versuchsgutes genommen.

Es handelte sich um ein Ferkel, das erst kurz vorher von der Mutter genommen und erst ein paar Wochen mit Sauermilch gefüttert war. Andere Schweine mit Milchfutter standen zu dieser Zeit nicht mehr zur Verfügung.

Durch die „Röhrchenmethode" konnte festgestellt werden, daß Str. lactis in einer Anzahl von 20—10 000 000 Keimen per Gramm Faeces bei diesem Schwein vorhanden war.

Die Ausführung der Untersuchungen wurde folgendermaßen gemacht: 1 g Faeces wurde abgewogen und Verdünnungen mit sterilem Wasser bis 1 : 10 000 000 angefertigt. Von diesen Verdünnungen wurde mittels Pipette 1 ccm entnommen und mehreren Röhrchen mit steriler Milch je ein Tropfen hinzugesetzt. Dies wurde mehrere Male wiederholt und die Röhrchen bei 30° bebrütet. Die Röhrchen, welche bei 30° innerhalb 24 oder 48 Std. koagulierten, wurden auf Str. lactis untersucht. Durch diese Methode konnte die Keimzählung verhältnismäßig sicher vorgenommen werden.

Ähnliche Serien wurden auch bei 45° bebrütet, wobei in einer bedeutend größeren Anzahl Röhrchen Koagulation eintrat; das Koagulum war schön und regelmäßig. Das Ergebnis läßt auf einen bedeutenden Reichtum an Milchsäurebakterien in den Faeces des untersuchten Schweines schließen.

Milchsäurestreptokokken der Gruppe I kommen demnach am häufigsten bei Schweinen im Alter von 2—4 Monaten vor, und die Häufigkeit hängt auch davon ab, wie reichlich die Schweine mit Milch gefüttert werden. Auch andere Futterarten schienen einen bestimmten Einfluß auf die Darmflora auszuüben. Beispielsweise wirkte Grünfutter hemmend auf die Entwicklung der Milchsäurestreptokokken der Gruppe I im Darm, während gesäuerte Kartoffeln günstig wirkten. Planmäßige Untersuchungen über die Auswirkung bestimmter Futterarten wurden nicht angestellt, aber durch die Fütterungsversuche mit verschiedenen Futterarten auf dem Versuchsgut konnte dort ein guter Überblick über den Einfluß dieser gewonnen werden.

Die Häufigkeit des Vorkommens von Str. lactis im Darm von Schweinen, die mit Sauermilch gefüttert wurden, soll durch spätere umfassendere Versuche geklärt werden.

5. Andere Milchsäurebakterien und für die Milchwirtschaft wichtige Mikroorganismen im Schweinedarm.

Die 3 Arten, Str. lactis, Str. bovis und Str. faecium, waren nicht die einzigen, die aus Schweinedarm isoliert wurden. Außer diesen wurde auch Str. thermophilus isoliert und Streptokokken, welche Milch nicht zu koagulieren vermochten.

Außer Streptokokken wurden auch Thermobakterien isoliert, so z. B. eine Langstäbchenart aus Anreicherungskulturen in Milch mit 0,20% Milch-

säurezusatz bei 37° und 45°. Diese Art enthielt reichlich Volutinkörner, und war hierin also den Species Thermobact. acidophilum oder Thermobact. bulgaricum zuzuteilen.

Thermobact. acidophilum wird von Henneberg (1) und Maurer und auch anderen als ein sehr wichtiger Mikroorganismus im Darme des Menschen angesehen.

Aus Saugferkeldarm konnten leicht Thermobakterien isoliert werden. Da sie im Darm von Schwein und Ferkel allgemein vorkommen, ist anzunehmen, daß der Schweinezüchtung auch hinsichtlich der Thermobakterien und ihrer Verbreitung eine gewisse Bedeutung für die Milchwirtschaft zukommt.

Aus Faeces von Schweinen, die mit Sauermilch gefüttert wurden, konnten auch einige Hefen isoliert werden, z. B. Eutorula, rote Torula, Kahmhefen und sporenbildende Milchzuckerhefen. Die letzteren zeichneten sich durch kräftige Gasbildung in Milch und durch Bildung nierenförmiger Sporen aus. Bei Schweinen, die mit gekochter Milch gefüttert wurden, schienen die Hefen langsam aus der Darmflora zu verschwinden. Beim Übergang der Fütterung von Sauermilch zu gekochter Milch war die Azidität des Darminhalts gesunken, so daß die Verhältnisse für die Hefen nicht mehr so günstig waren im Konkurrenzkampf mit den anderen Mikroorganismen. Nach Svanberg liegt (für die Kulturhefen) die optimale Wachstumsgeschwindigkeit bei $p_H = 5$; bei $p_H = 7$ erfolgt das Aussprossen nur noch sehr langsam. Da Hefen oft einen großen Einfluß innerhalb des Meiereiwesens auf Milchprodukte ausüben können, kann die Kenntnis über das Vorkommen von Hefen im Schweinedarm von gewisser Bedeutung sein.

Von Schimmelpilzen kommt Oospora lactis reichlich im Schweinedarm vor. Auch wenn das Tier mit gekochter Milch gefüttert wurde, konnte dieser Schimmelpilz sich im Schweinedarm entwickeln. Während Oospora lactis nicht im Dünndarm des Schweines, das mit gekochter Milch gefüttert war, gefunden wurde, trat dieser Pilz reichlich im Dickdarm und Enddarm auf, und zwar um so reichlicher, je größer die Entfernung vom Blinddarm nach dem Enddarm zu war.

Es ist beabsichtigt, sowohl auf Hefen wie auf Schimmelpilzen im Schweinedarm in einer späteren Sonderarbeit einzugehen.

6. Über die im Blinddarm vorkommenden Mikroben.

Über den Blinddarm und die Aufgabe, die dieses sackförmige Organ hat, ist oft diskutiert worden. Im allgemeinen wird der Blinddarm als ein völlig überflüssiges oder auch rudimentäres Organ angesehen, jedenfalls bei Menschen und bei Tieren, die keinen größeren Blinddarm besitzen. Beim Pferd, das einen sehr großen Blinddarm hat, soll er für die Cellulosevergärung wichtig sein (Mangold). Vielleicht ist aber die Bedeutung des Blinddarms für manche Tiere größer und zwar nicht nur betreffs der Zellulosevergärung. Im Blinddarm sammelt sich ein Teil der aufgenommenen Nahrungsstoffe, in denen sich eine reichliche Bakterienflora entwickelt, die sich ziemlich konstant hält, weil der Nahrungswechsel, was man wohl annehmen kann, dort ziemlich langsam vor sich geht. Bei Störung der Verdauung, die durch irgendeinen Anlaß hervorgerufen wird und Durchfall verursachen kann, können die Därme ziemlich rasch entleert werden. Hierdurch kann die Darmflora anormal werden, und dieser Krankheitszustand kann kürzere oder längere Zeit anhalten. Durch die im Blinddarm aufgespeicherten Bakterien kann aber mittlerweile die Bakterienflora langsam wieder zu der für das betreffende Tier normalen Darmflora zurückgeführt werden.

Dafür, daß der Blinddarm in dieser Hinsicht eine außerordentlich große

Rolle spielt, spricht der Fütterungsversuch Nr. 2. Das Schwein wurde mit saurer Milch gefüttert. Aus den Faeces konnten leicht Streptokokken der Gruppe I isoliert werden. Dann erhielt das Schwein 1 Woche lang kein Milchfutter, sondern Fischmehl. Nach dieser Woche wurde es mit gekochter Magermilch gefüttert. Als die Milchfütterung wieder begann, bekam das Schwein einen schweren Durchfall, der mehrere Tage andauerte. Milchsäurebakterien der Gruppe I konnten nach einwöchentlicher Fütterung mit gekochter Milch nicht nachgewiesen werden. Es ist also anzunehmen, daß der ganze Darm frei von Milchsäurebakterien der Gruppe I war. Der Blinddarm dagegen unterstand vielleicht nicht den genannten Einflüssen, sein Inhalt wurde nicht oder nicht vollständig entleert, so daß von hier aus nach Wiedereintreten des normalen Verdauungsganges wieder Milchsäurestreptokokken der Gruppe I und auch andere Darmbakterien in Darm und Darminhalt gelangen konnten.

Daß im Dünndarm des Schweines Bakterien in geringer Anzahl im Verhältnis zum Blinddarm und Dickdarm vorkommen, wurde an 4 frisch geschlachteten Schweinen aus dem Kieler Schlachthof bestätigt. Die Untersuchungen deuteten darauf hin, daß die mit der Nahrung aufgenommenen Bakterien im Verlaufe des Verdauungsweges getötet oder abgeschwächt wurden.

Heinick (Mangold) hat früher Ähnliches gefunden.

Nach Schieblich (Mangold) ist der Keimreichtum in der Maulhöhle bei Schweinen besonders groß. Er erklärt diese Tatsache durch die Art der Nahrung.

Daß mit der Nahrung aufgenommene Milchsäurebakterien sich im Dünndarm mengenmäßig stark verringern, wird von mehreren Autoren auch bei anderen Tieren, z. O. Ochsen, Kühen und Kälbern, gezeigt. Hier soll auf diese Verhältnisse nicht näher eingegangen werden. Wir wollen uns vielmehr darauf beschränken, hervorzuheben, daß Voß nach Berücksichtigung verschiedener Arbeiten zu folgendem Schluß kommt: „Zusammenfassend läßt sich also nur feststellen, daß stark hemmende und sogar abtötende Kräfte in größeren Darmabschnitten wirksam sind.“

Magen und Dunndarm konnen also als Wachter betrachtet werden, die den mit der Nahrung hereinkommenden Bakterien keinen freien Spielraum gewähren. Hierdurch kann sich die Darmflora sowohl bei Menschen wie bei Tieren ziemlich konstant erhalten. Die große Rekrutierung der Darmbakterien geht vom Blinddarm aus.

Daß man durch längere Zeit andauernde Aufnahme bestimmter Nahrungsmittel die Darmflora umstimmen kann, wird vielleicht manchmal weniger an der Art der mit der Nahrung aufgenommenen Bakterien liegen als vielmehr daran, daß je nach Art des Nahrungsmittels eine bestimmte Bakterienart nach Rekrutierung vom Blinddarm aus Gelegenheit zur Anreicherung bekommt. Hierdurch wird die Umstimmung langsam vor sich gehen, was sicher von großer Bedeutung ist, da eine zu schnelle Umstimmung für den Organismus schadlich sein könnte. Von diesem Gesichtspunkt aus muß der Blinddarm eine wichtige Aufgabe als Vorratskammer für die angepaßten Darmbakterien erfüllen.

D. Luftanalysen.

1. Luftanalysen in Schweine- und Kuhstall und Umgebung des Versuchsgutes in Friedrichsort.

Schon bei den vorbereitenden, vergleichenden Faecesuntersuchungen wurde die Frage aufgestellt, in welchem Maße die Schweinehaltung zur Ausstreuung von Milchsäurebakterien beitrage. Eine Infektion der Milch mit Milchsäurebakterien aus dem Schweinestall konnte ja nur durch direkte oder indirekte Vermittlung der Luft als Infektionsträger stattfinden. Hier lagen andere Bedingungen vor als im Kuhstall, wo eine Infektion der Milch z. B. während des Melkens durch Kot, Staub und Hautteilchen möglich ist.

Daher wurden schon in einem früheren Stadium der Untersuchungen Luftanalysen gemacht, um Klarheit darüber zu schaffen, in welchem Maße der Schweinestall eine Infektionsquelle für Milchsäurebakterien sein könnte. Im Februar 1935 wurden Glasschalen[1]) mit je 100 ccm steriler Milch in Schweineställen des Versuchsgutes der Luft ausgesetzt. Zum Zwecke des Vergleiches wurden gleichzeitig Glasschalen mit steriler Milch im Kuhstall aufgestellt sowie auch auf dem Hof des Versuchsgutes in einer Entfernung von ca. 100 m vom Stall.

In beiden Schweinestallen wurden je 2 Schalen, im Kuhstall sowie auf dem Hof in 100 m Entfernung ebenfalls je 2 Schalen aufgestellt. Als Platz wurden die Schweinestalle, ein unbenutzter Viehverschlag, der Eingang zu einem benutzten Verschlag, im Kuhstall der Gang zwischen den Reihen der Kühe gewählt. Die Aufstellung der Schalen erfolgte in der Zeit nach der Futterung, wenn die Tiere sich hingelegt hatten. Jede Schale wurde durch Abheben des Deckels je 5 Min. der Luft ausgesetzt. Darauf wurde der Inhalt an Ort und Stelle in sterile Kulturflaschen gegossen. Die Schalen, die auf dem Hofe in 100 m Entfernung von den Ställen aufgestellt waren, wurden 10 Min. lang der Luft ausgesetzt.

Die Kulturflaschen mit den verschiedenen Milchproben wurden bei 30⁰ bebrütet. Nach 18 Std. wurden die Kulturflaschen besichtigt. Alle Kulturflaschen mit Milch, die der Luft des Schweinestalles ausgesetzt waren, wiesen ein schönes Koagulum ohne Gas- und Molkenbildung auf. Die Milchkulturen aus dem Kuhstall koagulierten erst nach 27 Std. und die Kulturflaschen von dem Hof wiesen erst am nächstfolgenden Morgen Dicklegung auf. Das Koagulum wies auch in den beiden letzteren Fällen keine Gas- und Molkenbildung auf. Um festzustellen, welche Bakterienarten die Koagulation verursacht hatten, wurden Chinablauagar-Platten angelegt. Es zeigte sich hierbei, daß die Platten aus den Milchproben, die im Schweinestall aufgestellt waren, zu 100% mit Str. lactis besät waren. Abgeimpfte Stämme von diesen Platten koagulierten sterile Milch bei Zimmertemperatur in ein bis zwei Tagen, bei 30⁰ innerhalb 20 Std., bei 45⁰ hatten sie sich nicht entwickelt. Diese Stämme verursachten in der Milch einen rein säuerlichen, aromatischen Geschmack. In morphologischer Hinsicht wuchsen diese Stämme in Diplokokkenform oder Kurzketten; vereinzelt konnte man auch längere Ketten sehen. Einige Stämme (Nr. 86—91) wurden eingehender untersucht (s. Tab. 7). Es zeigte sich, daß die Stämme sehr gut mit den Stämmen in Tab. 1, die von Schweinen mit Sauermischfutter isoliert waren, übereinstimmten. Platten aus den Milchkulturen, die der Luft des Kuhstalles ausgesetzt worden waren, wiesen etwa 70% Kolonien des Str. lactis auf. Die übrigen 30% hatten größtenteils das Aussehen von Coli-aerogenes. Die Platten aus der Milchprobe vom Hofe (100 m) wiesen nur Kolonien von Str. lactis auf. Alle Str. lactis-Stämme vom Schweinestall, Hof und Kuhstall ergaben eine typische Lackmusmilchprobe bei 30⁰ innerhalb von 20 Std. Die Stämme vom Hof hatten im Verhältnis zu denen vom Schweinestall und Kuhstall bei Zimmertemperatur eine etwas geringere Wachstumsgeschwindigkeit. Um die Wachstumsgeschwindigkeit der hier isolierten Stämme in Milch bei Zimmertemperatur zu kontrollieren, wurde folgender Versuch vorgenommen:

Je 10 Stämme von jeder der 3 Infektionsstellen wurden in je ein Röhrchen sterile Magermilch geimpft. Gleichzeitig wurden auch 10 Stämme, die aus der Futtermilch stammten, in 10 Röhrchen geimpft. Alle Röhrchen, zusammen 40, wurden bei Zimmertemperatur bebrütet.

---

[1]) Sog. Käseschalen, Gefäße nach Form der Petrischalen 3,5 ccm hoch und mit einem Durchmesser von 11 cm.

Tabelle B.

Herkunft	Anzahl koagulierter Milchröhrchen						
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	Nicht koaguliert	Summe
Kuhstall	3	2	3	—	1	1	10
Schweinestall	6	2	1	1	—	—	10
Ca. 300 m vom Hof . .	—	—	7	3	—	—	10
Futtermilch	4	4	—	—	1	1	10

Aus Tab. B ergibt sich, daß die Koagulationszeit der Stämme vom Hof bei Zimmertemperatur größer war als diejenige der Stämme aus Schweine- und Kuhstall. Bei 30° war kaum ein Unterschied in der Koagulationszeit der Stämme des Hofes (100 m) von den übrigen festzustellen. Daß die Lactis - Stämme vom Hof eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit in Milch hatten, als die Stämme aus Schweine- und Kuhstall, läßt darauf schließen, daß die Stämme sich um so kräftiger bei niederen Temperaturen entwickeln, können, je frischer sie von der Rekrutierungsstelle in die Milch gelangen. Hierbei ist das Versuchsgut als Rekrutierungsstelle zu betrachten. Um eine Antwort hierüber geben zu können, war der Versuch zu wenig umfassend. Es wurde auch geprüft, wie lange die 40 isolierten Stämme in Milch bei Zimmertemperatur am Leben bleiben können, ohne umgeimpft zu werden. Hierbei zeigte sich, daß die Stämme, welche die Milch am schnellsten bei Zimmertemperatur koagulierten, auch am schnellsten abstarben. Die Stämme mit großem Entwicklungsvermögen begingen also sozusagen Selbstmord durch ihre außerordentliche Lebenskraft. Sherman und Kodge haben auch gefunden, daß Stämme, die sich langsam entwickeln, besser äußere Einflüsse vertragen können. Sie fanden, daß langsam wachsende Streptokokken die Säuerung besser aushalten als schnell wachsende Streptokokken. Die Proben wurden wiederholt mit ähnlichen Resultaten.

Aus den Ergebnissen dieser Versuche darf geschlossen werden, daß Milchstreptokokken entweder reichlicher im Schweinestall vorkommen als im Kuhstall, oder daß sie wenigstens ein kräftigeres Entwicklungsvermögen besitzen. Man muß berücksichtigen, daß die Milchschalen nur 5 Min. der Infektion durch die Luft ausgesetzt waren. Trotz dieser kurzen Zeit koagulierte die im Schweinestall infizierte Milch bei 30° C schon vor 18 Std., woraus klar hervorgeht, daß die Milchsäurestreptokokken aus der Luft des Schweinestalles eine sehr gute Entwicklungskraft in Milch besitzen. Dies konnte auch durch die isolierten Stämme selbst bestätigt werden (s. Tab. 7).

Daß die Milch, welche in ca. 100 m Entfernung von den Stallungen 10 Min. der Luftinfektion ausgesetzt war, ebenfalls von Str. lactis koaguliert wurde, läßt darauf schließen, daß die Luft der gesamten Umgebung mit Milchsäurebakterien „infiziert“ war.

Gleichzeitig mit den Schalen steriler Milch wurden auch Agarplatten zur Ermittlung der Luftinfektion in den Kuh- und Schweineställen des Versuchsgutes in Friedrichsort aufgestellt.

In jeden Stall wurden 4 verschiedene Platten gestellt, und zwar je eine Milchagarplatte, hergestellt aus Milch und Wasseragar, je eine Milchzuckerbouillonagarplatte mit Kreidezusatz, je eine Chinablaumilchzucker-Bouillonagarplatte und je eine Traubenzucker-Bouillonagarplatte mit Kreidezusatz. Verschiedenartige Agarplatten wurden deshalb angewandt, weil ausprobiert werden sollte, ob sich Unterschiede

im Anwachsen der Milchsäurestreptokokken aus der Luft bei den verschiedenen Nährböden ergeben würden.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob Str. lactis vielleicht einen bestimmten Nährboden bevorzugt. Jede Platte wurde 2 Min. dem Einfluß der Stalluft ausgesetzt und dann bei 30° bebrütet. Auf allen Milchzucker- und Traubenzuckeragar-Platten traten mehr oder minder säuernde Kolonien auf. Am reichlichsten traten sie auf den Traubenzucker-Platten auf. Auf den Milchagar-Platten konnte man nicht sehen, welche Kolonien säuerten, so daß die Arten schwieriger zu erkennen waren. Aber da die Kolonien der Milchsäurebakterien makroskopisch ein typisches Aussehen haben, konnten sie doch von anderen getrennt werden. Bei den Milchwasseragar-Platten wurde möglichst wenig Wasseragar gebraucht, so daß der Nährboden nur gerade erstarrte. Dies geschah deshalb, damit der Nährboden sich weitgehendst wie reine Milch verhielt. Eine große Anzahl säuernder Kolonien von Traubenzucker- und Milchzuckeragar-Platten wurde in sterile Milch übergeimpft, ebenso Kolonien von den Milchagar-Platten, die auf Grund ihres Aussehens für Milchsäurebakterien gehalten werden konnten. Kein einziger der abgeimpften Stämme konnte Milch bei 30° innerhalb 24 Std. koagulieren. Die Koagulation trat, wenn überhaupt, erst nach mehreren Tagen ein.

2. Luftanalysen im Kuhstall in der Stadt Kiel.

Mit Rücksicht auf die ausgeführten Luftanalysen auf dem Versuchsgut in Friedrichsort lag nun die Frage nahe, ob die Milchsäurestreptokokken, Str. lactis, in der Luft des Kuhstalles des Versuchsgutes aus dem Kuhstall selbst stammten oder ob sie von einer anderen Infektionsquelle dorthin gelangt waren. Die Schweineställe lagen nicht weiter als ca. 20 m vom eben genannten Kuhstall entfernt. Zur Beantwortung der Frage waren die Verhältnisse sehr günstig.

Zu der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt in Kiel gehörte auch ein Kuhstall, der im Innern der Stadt Kiel neben den zur Anstalt gehörenden Institutsgebäuden lag, fern von allen sonst zu einem Landgut gehörenden Gebäuden, Ställen usw. In diesem Kuhstall wurden 5 Kühe gehalten. Dort wurden nun, wie in dem Kuhstall in Friedrichsort, Glasschalen mit steriler Milch aufgestellt, und zwar wiederum, nachdem die Kühe sich nach der Fütterung zur Ruhe gelegt hatten. Die Milch wurde, wie auf dem Versuchsgut in Friedrichsort, gleich an Ort und Stelle in sterile Kulturflaschen gegossen. Die Milch, die 10 Min. der Luftinfektion ausgesetzt war, koagulierte bei 30° nach 3 Tagen; die beiden Milchproben, die je 5 Min. der Luftinfektion ausgesetzt waren, koagulierten bei 30° nach 5 bzw. 6 Tagen. In allen Schalen befand sich nach der Dicklegung ein loses, unappetitliches Koagulum mit viel Molke. Von Chinablaumilchzuckeragarplatten konnten keine Str. lactis-Keime isoliert werden, sondern hier traten nur verhältnismäßig schwach säuernde Kolonien neben kleinen, weißglänzenden Kolonien auf. Auch befanden sich auf diesen Platten Kolonien von Stäbchenbakterien. Ein großer Teil der schwachsäuernden Kolonien wurde in Milch abgeimpft; sie hatten ein Temperaturoptimum bei 37° und ergaben eine atypische Lackmusmilchprobe. Bei 30° und darunter entwickelten sie sich in Milch sehr langsam. In Federstrichen von Traubenzuckerbouillon wuchsen sie in Diplokokken oder kürzeren Ketten. Die Stämme müssen als typische Fäkal-Streptokokken angesehen werden.

Aus dieser Untersuchung geht eindeutig hervor, daß der Kuhstall, isoliert liegend, keine Infektionsquelle für solche Streptokokken darstellt, die in Milch ein starkes Wachstumsvermögen aufweisen, wie Str. lactis, das „gewöhnliche“ Milchsäurebakterium.

3. Luftanalysen mit der Röhrchenmethode

a) in Schweineställen in dem Versuchsgut Friedrichsort.

Es erschien eigentümlich, daß Milch, die der Infektion durch die Luft des Schweinestalles 5 Min. ausgesetzt war, schon nach einigen Stunden koagulierte und Str. lactis aufwies, während auf den gleichzeitig aufgestellten Agarplatten keine einzige Kolonie von Str. lactis gefunden werden konnte. Es sei daran erinnert, daß auf den „Direktplatten“ von Schweinefaeces nur sehr wenig Str. lactis vorkam, bei vorheriger Überimpfung in Milch dagegen so reichlich, daß der Gedanke auftauchen mußte, Str. lactis könnte vielleicht in größerem Ausmaße im Schweinedarm vorhanden sein, als die Direktplatten anzeigten. Diese Verhältnisse waren den hier vorliegenden analog. Es war deshalb zu prüfen, ob Str. lactis reichlicher in der Luft des Schweinestalles vorkommt, als die Ergebnisse der Agarplatten annehmen ließen, ferner ob Str. lactis auf Agarplatten nicht anzuwachsen vermag oder ob er wirklich nur in so geringer Zahl in der Stalluft vorkommt, wie die Ergebnisse der Agarplatten anzeigen und sich nur in Milch so rasch vermehrt. Durch die Luftinfektionsversuche von Milch im Schweine- und Kuhstall konnte nachgewiesen werden, daß Str. lactis in der Luft des Schweinestalles und Kuhstalles in Friedrichsort vorkam, jedoch nicht im Kuhstall in der Stadt Kiel. Dagegen konnte durch die ausgeführten Untersuchungen mit Milchschalen und Agarplatten nicht festgestellt werden, in welcher Menge Str. lactis in der Luft vorkam. Diese Frage wurde auf folgende Weise gelöst:

Reagenzgläschen mit einem Durchmesser von 1,4 cm wurden zu $^2/_3$ mit Milch gefüllt und nach Aufsetzen von Wattestopfen sterilisiert. Darauf wurden immer je 20 Röhrchen in einen Pappkarton gestellt und zwar so, daß jedes Röhrchen mit Hilfe von Zellstoff aufrecht stand und zu den Nachbarröhrchen einen gewissen Abstand erhielt. Zwei solcher Kartons mit Milchröhrchen wurden im Schweinestall in Friedrichsort aufgestellt, nachdem die Schweine sich nach der Fütterung zur Ruhe gelegt hatten und 5 Min. der Infektion durch die Stalluft ausgesetzt. Gleichzeitig mit den Röhrchen wurden auch in den Ställen 2 Chinablaumilchzuckeragarplatten aufgestellt. Diese Platten hatten eine Oberfläche von 63 qcm, was einer infizierbaren Milchoberfläche von 2 Kartons Röhrchen entsprach. Sie wurden dem Einfluß der Luftinfektion 2½ Min. ausgesetzt. Röhrchen und Platten wurden dann bei 30° bebrütet.

Tabelle C.

Nach Tagen	Anzahl koagulierter Röhrchen	Aussehen
1	6	Geleeartiges, schönes Koagulum ohne Molke und Gasbildung
2	9	Geleeartiges, schönes Koagulum ohne Molke und Gas. Ein Röhrchen mit käsigem, zerrissenem Koagulum
3	7	Schön koaguliert, 2 Röhrchen mit reichlicher Gasbildung
10 und darüber	17	3 Röhrchen schön koaguliert, alle übrigen mit unappetitlichem, losem Koagulum. 1 Röhrchen nicht koaguliert

Tabelle D.

Agarpl. Nr.	Aussehen der Platte	Lackmusmilch nach 1 Tag Reakt.	Lackmusmilch nach 1 Tag Koagul.
1	Reichlich kräftig säuernde Milchsäurebakterien und einige weiße Kokkenkolonien	t	+
2	Reichlich kräftig säuernde Milchsäurebakterienkolonien	u	—
3	,, ,, ,, ,,	r	—
4	,, ,, ,, ,,	t	+
5	,, ,, ,, ,,	r	—
6	,, ,, ,, ,,	t	+
7	,, ,, ,, ,,	r	—
8	Stark und schwach säuernde Kolonien	t	+
9	Stark säuernde Kolonien	t	+
10	Stark säuernde Kolonien und Kokken	t	+
11	Schwach säuernde Kolonien	u	—
12	Stark säuernde Kolonien	t	+
13	Stark sauernde Kolonien	t	+
14	Stark säuernde Kolonien	t	+
15	Stark säuernde Kolonien und Kokken	u	—
16	Stark und schwach säuernde Kolonien	t	+
17	Stark säuernde Kolonien	a	+
18	Nur Kolonien von weißen Kokken. Aromatischer Geruch	r	—
19	Schwach säuernde Kolonien	r	—
20	Stark säuernde Kolonien	t	+
21	Schwach säuernde Kolonien mit Kokken	u	—
22	Schwach säuernde Kolonien mit Kokken	u	—
23	Schwach säuernde Kolonien mit Kokken	u	—

t = typisch, r = reduziert, a = atypisch, u = unverändert.

Durch Vergleich der Zahl der durch Str. lactis koagulierten Milchröhrchen mit der Zahl der Kolonien von Str. lactis auf den Agarplatten mußte festzustellen sein, ob Str. lactis überhaupt auf den Platten anwachsen konnte bzw. in welchem Maße. Angenommen, es sei in allen 40 Röhrchen die Milch durch Str. lactis koaguliert, dann müßte dies auf beiden Platten dem Auftreten von mindestens ca. 40 Kolonien des Str. lactis entsprechen, da die Platten wegen ihrer doppelt so großen Oberfläche nur 2½ Min. der Infektion durch die Luft ausgesetzt waren. In Tabelle C ist die Koagulationszeit und das Aussehen des Koagulums der verschiedenen Röhrchen angegeben. Von allen koagulierten Röhrchen wurden Chinablauagarplatten angelegt und von den Kolonien Abimpfungen gemacht. In Tabelle D ist die Reaktion derartiger Stämme in Lackmusmilch und das Aussehen der Kolonien auf den Agarplatten angegeben. Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß eine große Anzahl dieser Stämme Milch innerhalb 24 Std. bei 30° koagulierte und eine typische Lackmusmilchprobe ergab; diese Stämme waren sämtlich Str. lactis. Auf den beiden Agarplatten, die gleichzeitig aufgestellt waren, befanden sich zusammen 12 Milchsäurebakterien-Kolonien.

Außerdem waren auf den Platten überwiegend gelbe und weiße Mikrokokken und auch einzelne Coli-aerogenes-Kolonien. Die weißen Kolonien hatten Halbkugelform, die gelben hatten etwas flachere Form. In Klatschpräparaten war festzustellen, daß es sich um Mikrokokken in Ketten- oder Traubenform handelte.

Die 12 Kolonien von Milchsäurebakterien wurden sämtlich in sterile Milchröhrchen abgeimpft, von denen nach Anwachsen der Stämme neue Platten gegossen wurden. 3 von diesen Stämmen konnten als Str. lactis,

identifiziert wurden. Aus 14 von den 40 aufgestellten Milchröhrchen konnte Str. lactis isoliert werden. Das sind 35% sämtlicher Röhrchen. Aus diesem Versuch ging hervor, daß Str. lactis reichlicher in Luft vorkam als die angestellten Platten zeigten. Außer den Röhrchen und Platten wurden auch 2 Schalen mit steriler Milch der Luftinfektion ausgesetzt, wie bei dem früheren Versuch. Die eine Schale wurde 2,5 Min. lang offen gehalten, die andere 5 Min.; die Milch war erst innerhalb 40 Std. (durch Str. lactis) koaguliert. Es lag also keine so rasche Koagulation wie bei dem früheren Versuch (18 Std.) vor.

Die längere Koagulationszeit bei der Wiederholung dieses Versuchs kann darauf zurückzuführen sein, daß in dem Schweinestall des Versuchsgutes nur noch 4 Schweine gegenüber 50 Schweinen bei Ausführung des ersten Versuchs waren; auch waren die Wände und Verschläge des Stalles schon gereinigt und neu gekalkt.

b) in Schweineställen in Raisdorf.

In den zur Meierei in Raisdorf bei Kiel gehörenden Schweineställen mit 500—600 Schweinen wurden weitere Luftuntersuchungen ausgeführt. Da in der Meierei hauptsächlich Käse hergestellt wird, werden die Schweine mit Molke gefüttert, die mit Schrot gekocht wird. Im Schweinestall A wurden 40 Milchröhrchen 5 Min. dem Einfluß der Luftinfektion ausgesetzt und im Schweinestall B 10 Min. Die ersteren wurden bei 30°, die letzteren bei Zimmertemperatur bebrütet. Aus Tabelle E ist die Koagulationszeit und das verschiedene Aussehen der Milchröhrchen nach der Bebrütung zu ersehen. In den Schweineställen und ca. 30 m davon entfernt, wurden „Käse“-Schalen mit steriler Milch und Chinablauagar-Platten aufgestellt und 10 Min. lang der Infektion ausgesetzt.

Tabelle E.

Nach Tagen	Anzahl koagulierter Röhrchen	Schweinestall Nr. 1 Raisdorf (Thermostat 30°) Luftinfektion 5 Min.
3	6	Schönes gleichmäßiges Koagulum
2	20	Schönes, gleichmäßiges Koagulum, 2 Röhrchen Gas und Molke
3	2	1 Röhrchen mit zerrissenem Koagulum
4	12	Ein Teil derselben mit Gasbildung
		Schweinestall Nr. 2 Raisdorf Luftinfektion 10 Min. (Zimmertemperatur)
2	14	Schönes, gleichmäßiges Koagulum
3	24	Schönes, gleichmäßiges Koagulum
		Nicht koaguliert 2 Röhrchen

Auf den 8 Agarplatten (4 aus jedem Stall) wuchsen hauptsächlich gelbe und weiße Kokken-Kolonien. Unter diesen befanden sich Kolonien, die durch Chinablau gefärbt waren. Von den Platten konnte kein einziger Str. lactis-Stamm isoliert werden.

Da der größte Teil der Mikrokokkenkolonien infolge Alkalibildung die Chinablauplatten stark aufhellte, wäre es vielleicht möglich gewesen, daß hierdurch Milchsäurebakterienkolonien nicht in Erscheinung traten; aber es muß angenommen werden, daß stark säuernde Arten wie Str. lactis sich durch ihr kräftiges Säuerungsvermögen zu erkennen gegeben hätten, wenn sie überhaupt angewachsen wären.

Auf Agarplatten, die in 30 m Entfernung von den Ställen auf dem Hof neben den Käseschalen mit Milch aufgestellt waren, wuchsen nur gelbe und rotgelbe, nichtsäuernde Kokken-Kolonien. Von den aus dem Schweinestall A bei 30° bebrüteten Milchröhrchen koagulierten 26 Milchproben, also 65% innerhalb 2 Tagen mit einem tadellosen Koagulum ohne Molkenabscheidung. Von den Röhrchen aus dem Schweinestall B bei Zimmertemperatur koagulierte die Milch in 38 Röhrchen, also 95%, ebensogut. Näher untersucht wurden nur die Röhrchen aus Stall B. Von jedem dieser wurden Chinablauagarplatten angelegt. Auf allen Platten wuchsen Kolonien von kräftig säuernden Milchsäurebakterien. Alle abgeimpften Stämme ergaben auch eine typische Lackmusmilchprobe innerhalb 20 Std. bei 30°.

4. Luftanalysen mit der Röhrchenmethode im Kuhstall der Forschungsanstalt in Kiel.

Aus „Käse"-Schalen, die mit steriler Milch im Kuhstall der Forschungsanstalt aufgestellt und bei 30° bebrütet waren, hatte sich Str. lactis nicht isolieren lassen, deshalb wurden nochmals Luftinfektionsversuche in diesem Kuhstall vorgenommen, und zwar diesmal in der gleichen Art wie in den Stallungen in Raisdorf und in Friedrichsort, mit Hilfe von Chinablauagarplatten und der Röhrchenmethode. Die ersten Luftinfektionsversuche in diesem Kuhstall waren im Winter ausgeführt, diese in den Sommermonaten.

Tabelle F.

Tage	Dickgelegte Röhrchen	Kuhstall Stadt Kiel Aussehen (30° C)
3	2	Koaguliert mit kräftiger Kaseinspaltung
7	2	Koaguliert unter reichlicher Molkebildung und mit unappetitlicher Koagulation
9	1	Schleimiges Koagulum
11	9	Loses, unappetitliches Koagulum, reichlich Molke
13	1	Koaguliert mit milchiger Molke
15	1	Loses unappetitliches Koagulum. Nicht koaguliert. 24 Röhrchen

In Tabelle F ist der Einfluß der Luftinfektion auf die Milchröhrchen angegeben. Von 40 aufgestellten Röhrchen waren 2 nach 3 Tagen koaguliert, 2 nach 7, 1 nach 9, 9 nach 11, 1 nach 13 und 1 Röhrchen nach 15 Tagen. 24 Röhrchen wurden überhaupt nicht dickgelegt. Von allen koagulierten und einigen nicht-koagulierten Milchröhrchen wurden Chinablauagar-Platten angelegt. Auch sämtliche nicht-koagulierten Röhrchen waren durch Bakterien infiziert, und die Milch mehr oder minder angegriffen. Einige dieser Röhrchen enthielten Mikrokokken. Mikroskopisch konnte festgestellt werden, daß die Fettkügelchen angegriffen waren. In Tabelle G sind die Ergebnisse einiger Platten von solchen Röhrchen zusammengestellt. Aus keinem der Röhrchen konnte Str. lactis isoliert werden. Dagegen konnten Enterokokken mit einer atypischen Lackmusprobe (Temperaturoptimum bei 37° und sehr langsamem Wachstum bei 30° und tiefer reingezüchtet werden.

Auf Chinablauagar-Platten, die im Kuhstall aufgestellt waren, wuchsen überwiegend gelbe und weiße Kokken, aber auch andere, wie Coli aerogenes. Auch einige Milchsäurebakterien-Kolonien waren auf den Platten

Tabelle G.

Nr.	Aussehen der Platten
1	Ziemlich reichlich dunkelblaue, typische Milchsäurebakterienkolonien (im Klatschpräparat kräftige Diplokokken). Daneben schwach säuernde, kleine Kolonien und gelbe und weiße Kokkenkolonien. Weiße, schleimbildende, alkalibildende Kolonien
2	Wie 1
3	Weiße und blaue Kokkenkolonien
4	Blaue, große Kolonien (Klatschpräparat Kokken). Kolonien hatten Chinablau so stark zu sich gezogen, daß sie selbst dunkelblau und die Platte aufgehellt war
5	Große Anzahl halbweißer, glänzender Kolonien. Klatschpräparat mittellange, stark bewegliche Stäbchen
6	Blaue Kokkenkolonien und flache, ziemlich große, blauweiß gefärbte, matte Kolonien
7	Schwach säuernde, kleine, glänzende Kolonien
8	(Aus einem nicht koagulierten Röhrchen) hauptsächlich Kokken

vorhanden. Auf einer dieser Direktplatten trat eine Kolonie mit typischem Str. lactis-Aussehen auf. Obwohl auf dieser Platte überwiegend Alkalikolonien wuchsen, hatte diese Kolonie einen deutlichen Säurehof. Es handelte sich um einen Milchsäurestreptokokkus, der Milch bei 30° innerhalb 24 Std. koagulierte, eine typische Lackmusmilchprobe ergab und in langen Ketten wuchs. Dieser Stamm konnte nach näheren Untersuchungen zu Str. cremoris O.-J. gerechnet werden. Auch alle anderen Milchsäurebakterien-Kolonien wurden in Lackmusmilch abgeimpft. Es handelte sich um „Enterokokken“. Außerdem konnte Str. liquefaciens nachgewiesen werden.

E. Ergebnisse.

a) Faeces- und Darmuntersuchungen.

Aus den Darmuntersuchungen von Schweinen, Ferkeln, Kühen und Kälbern geht folgendes hervor: Im Schweine- und Ferkeldarm entwickeln sich unvergleichbar mehr Milchsäurebakterien als im Kuh- und Kälberdarm; Str. lactis kann sich im Schweinedarm ausbreiten, aber nicht im Kuhdarm; Str. lactis entwickelt sich nur im Darm von Schweinen, die mit Kuhmilch gefüttert wurden; bei Saugferkeln, die nur von Muttermilch lebten, konnte Str. lactis nicht aus dem Darm isoliert werden.

Die Annahme, gerade der Darm des Schweines biete, besonders bei Milchfütterung, alle Voraussetzungen zur Entwicklung von Milchsäure-Streptokokken, stimmte also in vollem Umfange mit der Wirklichkeit überein.

b) Luftanalysen.

Aus diesen Versuchen über die Luftinfektion im Schweine- und Kuhstall geht hervor, daß die Schweineställe einen richtigen Infektionsherd für diejenigen Streptokokken darstellen, die sich in Milch rasch zu vermehren vermögen. Dagegen zeigten die Untersuchungen, daß im Kuhstall nur wenige dieser Milchsäurestreptokokken vorhanden waren, wenn der Kuhstall von den Schweineställen und anderen zu einem landwirtschaftlichen Betrieb gehörenden Gebäuden usw. isoliert war. Durch die „Zellmethode“ konnte durch Vergleich mit gleichzeitig aufgestellten Agarplatten nachgewiesen

werden, daß Milchsäurestreptokokken nicht immer fähig sind, auf den Agarplatten anzuwachsen; besonders gilt dies fur Str. lactis. Ein deutlicher Beweis hierfür sind die Ergebnisse der Luftinfektionsproben im Schweinestall in Raisdorf. Hier konnte aus mehreren Milchröhrchen Str. lactis isoliert werden, während auf den Agarplatten keine einzige Str. lactis-Kolonie wuchs. Daß Str. lactis unter gewissen Umständen direkt auf Platten anwachsen kann, geht aus den Versuchsergebnissen im Schweinestall in Friedrichsort hervor, wo drei Stämme von Direktplatten isoliert werden konnten. In welchem Maße die Streptokokken aus der Luft bzw. aus dem Futter oder dem Kot stammten, wurde in besonderen Versuchen geprüft; eine Auswertung dieser Ergebnisse ist noch nicht erfolgt.

(Fortsetzung folgt im nächsten Heft.)

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Naumann, E., Die Massenzucht von nannoplanktonischen Grünalgen als Futter für Wassertiere. **Abderhalden, E.**, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. IX, Methoden zur Erforschung der Leistungen des tierischen Organismus. T. 2, 2. Hälfte, H. 6 (Schluß), 1175—1188, 9 Textabb.

—, Neue Einrichtungen und Arbeitsmethoden im limnologischen Laboratoriumsbetrieb. Ebenda. 1789—1838; 38 Textabb.

Wasmund, E., Technik der Unterwasserbohrung auf Bohrfähren. Ebenda. 1839—1878, 23 Textabb.

Utermöhl, H., Quantitative Methoden zur Untersuchung des Nannoplanktons. Ebenda. 1879—1937, 18 Textabb.

Die Ausführungen der ersten der beiden nach dem Tode Einar Naumanns erschienenen Arbeiten gehen von der Erfahrungstatsache aus, daß sich zur Massenaufzucht von Zwergplankton ein 1‰ Zusatz von Heringsmehl vorzüglich bewährt hat. In derartig geimpften normalen Oberflächenwassern entwickeln sich u. a. Chlamydomonaden, Scenedesmus, Dactylococcus, Nannochloris. Durch wiederholte Verdünnungen und Weiterzucht können gegebenenfalls auch speziesreine Kulturen erhalten werden. Verf. schildert dann die für die Aquarienkulturen erforderlichen Durchlüftungs- und Beleuchtungseinrichtungen. An Stelle von Heringsmehl kann auch Urin verwendet werden, doch sind hierbei bisher unerklärliche Fehlschläge nicht ausgeschlossen.

Die zweite Darstellung umfaßt 12 verschiedene Themen, die besonders fur solche Institute wertvoll sind, die in möglichst unberührter Natur experimentell zu arbeiten beabsichtigen. Verf. beginnt seine praktischen Ausführungen zunächst mit Angaben über die Anlage der Wasserversorgung limnologischer Laboratorien und schließt daran seine praktischen Erfahrungen über den Nachweis von Metallvergiftungen in Aquarienanlagen und ihrer Beseitigung. Hierbei ist die Daphnia magna-Probe von ausschlaggebender Bedeutung.

Ausführlich werden anschließend die Verwendung von Windmotoren und die Einrichtung von zentralen Durchlüftungsanlagen erörtert. Diese Ausführungen sind durch ein reichliches Bildmaterial unterstützt. Die weiteren Absätze gehen auf die Einrichtung von Aquarienhäusern, einer neuen Ausführung der Halbfässeranlagen, die Einrichtung von Betonbecken im Freiland, die Schaffung künstlicher Bachanlagen und die Einrichtung von Aquarienanlagen bei Oberbeleuchtung ein. Zum Studium von Schichtungen im Wasser wird der Bau eines aus Kulvertröhren zusammengesetzten Turms empfohlen, in dessen Wand in kleinen Abständen Glasröhren eingesetzt sind, aus denen das Wasser aus verschiedenen Höhen abgezapft werden kann. Weiter bespricht Verf. die Einrichtung von Aquarien mit Ruhrwerk, die zur Zucht von Tieren und Pflanzen strömender Gewässer, u. a. auch polysaprober Organismen (Sphaerotilus) sowie solcher Plankter dienen, die an sich nur langsam beweglich sind und in stehenden Aquarien leicht absterben. Der letzte Absatz streift kurz die Gesichtspunkte, die bei der Schaffung von Aquarien mit durchströmendem Wasser zu berücksichtigen sind.

Die dritte von Wasmund stammende Arbeit wendet sich besonders an den Geologen und den Wasserbautechniker und befaßt sich mit der Bohrtechnik als solcher, tritt aber auf die wissenschaftliche Bearbeitung der Bohrproben selbst nicht ein. Trotz dieser Zielsetzung sind die Ausfuhrungen aber auch für den limnologisch arbeitenden Biologen von hohem Werte, da sie auch ihn mit einem praktisch erprobten Instrumentarium (Bohrkopf, Gestänge, Wasserfahrzeuge) und der Handhabung der Fähre (Fahren, Verankern) vertraut machen und ihm dadurch die Möglichkeit geben, die bisher an mikrofossil analytischen Mooruntersuchungen gewonnenen Ergebnisse an Hand von Bohrproben aus Seen zu ergänzen und zu erweitern. 3 Querprofile nacheiszeitlicher Ablagerungen ostholsteinischer Seen weisen auf diese noch wenig beschrittene Forschungsrichtung.

Die letzte, von Utermöhl stammende Abhandlung fixiert zunächst den Begriff Nannoplankton als Gesamtheit von Organismen von 5—50 μ Durchmesser und schildert dann die Untersuchung von plio- und miozonalen Planktonschichtungen.

Bei ersteren werden besonders größere Wasserschöpfer, bei letzteren feiner arbeitende und kleinere Apparaturen verwendet. U. a. wird der vom Verf. konstruierten verschließbaren Planktonröhre Erwähnung getan. Die Frage, ob das Plankton lebend oder fixiert zu untersuchen ist, beantwortet Verf. dahingehend, daß beide Verfahren nebeneinander vorzunehmen sind, ersteres, um die auftretenden Arten zunächst sicher bestimmen zu können, letzteres, um die rasch beweglichen und die leicht vergänglichen Formen bei der zeitraubenden Zählung erfassen zu können.

Die Verarbeitung im Laboratorium erfolgt durch Anreicherungsverfahren verschiedener Art (Filter, Sedimentation, Zentrifugieren) oder durch die direkte Kammermethode, woran sich das Auszählen der Proben anschließt. Hierzu bringt Verf. zahlreiche praktische Hinweise. Zum Schluß wird noch der Kulturmethoden gedacht.

Den Abschluß der vorliegenden Lieferung 452 bildet ein Sachregister des ganzen Bandes (S. 1939—1987) und das Inhaltsverzeichnis des vorliegenden 2. Teilbandes (I—XXI). Beger (Berlin-Dahlem).

Pape, H., Die Praxis der Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen der Zierpflanzen. 2. Aufl. VIII + 427 S., 8 farb. Taf., 303 Textabb. Verlag P. Parey, Berlin. 1936. geb. 18.— RM.

Wenn ein Buch, wie das vorliegende, innerhalb von 4 Jahren bereits in 2. Auflage erscheint, so ist damit eindeutig erwiesen, daß es seinen Zweck erfüllt. Es ist deshalb auch natürlich, daß die 2. Auflage trotz gründlicher Überarbeitung und Ergänzung im wesentlichen im Aufbau gegenüber der 1. Auflage unverändert geblieben ist.

Im ersten, allgemeinen Teil wird einleitend kurz auf die wirtschaftliche Bedeutung der Zierpflanzenkrankheiten und -schädigungen eingegangen, und es werden die Ursachen dieser Krankheiten und Schädigungen besprochen; dann folgt ein sehr ausführlicher Abschnitt über Verhütungs- und Bekämpfungsmaßnahmen kultureller, biologischer und technischer Art.

Im zweiten, besonderen Teil wird zunächst auf die pflanzlichen und tierischen Parasiten mit größerem Wirkungskreis eingegangen und darauf werden, in alphabetischer Reihenfolge nach den Zierpflanzen geordnet, die Krankheiten und Schädigungen einzelner Pflanzenarten und -gattungen abgehandelt.

Das wichtigste Schrifttum, ein Verzeichnis der deutschen und lateinischen Namen der im Text aufgeführten Zierpflanzen und ein Sachregister sind angefügt.

Die klare, zweckmäßige Darstellung unter ständiger Berücksichtigung der praktischen Erfordernisse und die gute Illustration sichern auch der 2. Auflage dieses Nachschlagewerkes eine günstige Aufnahme. Stapp.

Huber, B., Der Wärmehaushalt der Pflanzen. 148 Seiten mit 37 Abb. u. vielen Tab. (Naturwissenschaft u. Landwirtschaft, Heft 17.) Freising-München (Datterer & Co.) 1935. 5,60 RM.

Einleitend gibt Verf. einen kurzen Überblick über die bisherigen Anschauungen hinsichtlich des Wärmehaushalts der Pflanzen, der die fast völlige Vernachlässigung dieses wichtigen physiologischen Problems erkennen läßt. Erst mit dem Aufschwung der experimentellen Ökologie hat auch der Wärmehaushalt in weiteren Kreisen Beachtung gefunden. Besonders wertvoll ist unter Anführung der einschlägigen Literatur der Hinweis auf die vielfach ähnlichen Fragestellungen im Tierreich bei den Poikilothermen, so daß hier wieder einmal offenbar wird, welchen großen Nutzen eine heute leider den meisten Forschern fehlende, die Gebiete der Botanik und Zoologie gleichzeitig einigermaßen umfassende Kenntnis haben muß. In dem ersten Hauptteil werden sodann die temperaturbestimmenden Faktoren, in dem zweiten die tatsächlich beobachteten Pflanzentemperaturen besprochen, während in einem Schlußabschnitt die biologische Bedeutung des Wärmehaushalts dargelegt wird. So erweist sich die Abhandlung als ein außerordentlich wertvoller Wegweiser durch das interessante Gebiet, der auch klar erkennen läßt, wo weitere Forschungen einzusetzen haben. Braun (Berlin-Dahlem).

Allgemeines und Methodisches.

Schweizer, G., Die Kaltsterilisation von Nährböden und ihre Bedeutung für die Reinkultur von Mikroorganismen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 297—314.)

Verf. beschreibt eingehend eine Apparatur, mit Hilfe deren Nährböden auf kaltem Wege durch die verschiedensten flüchtigen Antiseptica, bei nachträglicher Entfernung dieser Stoffe, sterilisiert werden können. Der Wert liegt vor allem darin, daß empfindliche Substrate geschont werden, z. B. die Enzymtätigkeit aufrechterhalten werden kann, bei völliger Sterilisation. So können anspruchsvolle Mikroorganismen kultiviert werden, die auf synthetischen Nährböden nicht oder nur schlecht wachsen, wie B. Tuberculosis und diphteriae, koprophile Pilze, Claviceps purpurea, Empusa Muscae, Lamia usw. Auch Cuscuta europaea will Verf. auf kaltsterilisierten Pflanzensäften bis zur Blüte kultiviert haben.

Da es sich nur um die Darstellung der Methodik handelt, sind praktische Kulturversuche nur summarisch erwähnt, so daß eingehendere Darstellungen abzuwarten sind. Jedoch verdient die Methode eingehende Beachtung. Rippel (Göttingen).

Ehrismann, O., Askorbinsäurehaltige Nährmedien für anaerobe Bazillen. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 544—554.)

Askorbinsäure (Vitamin C) begünstigt das Wachstum obligater Anaerobier und ermöglicht es auch in Gegenwart von Sauerstoff. Sie steht an Wirksamkeit dem Cystein nicht nach. Die Wirkung beider Substanzen wird durch ihre leichte Oxydierbarkeit begrenzt. Vielleicht ist aber die Unmöglichkeit, anaerobe Bazillen in Gegenwart von Luftsauerstoff zu züchten — neben der Lage des Redoxpotentials und der schädlichen Wirkung evt. gebildeten Wasserstoffsuperoxyds — wenigstens z. T. überhaupt darauf zurückzuführen, daß diese Mikroben auf Substanzen angewiesen sind, die gerade infolge ihres niederen Potentials in Luft sofort (auch irreversibel) oxydiert werden. Und sowohl für Askorbinsäure wie auch Cystein gilt, daß parallel mit der Erniedrigung des Potentials bei steigendem p_H auch die irreversible Oxydation zunimmt. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Paley, T., Zur Frage der Aufbewahrung und Erhaltung von Aspergillus niger-Stämmen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 206—209.)

Verf. prufte, ob die Inkonstanz des Zitronensäurebildungsvermögens bei Aspergillus niger. die bei Haltung in Kultur zu beobachten ist, durch trockenes Aufbewahren reifer Sporen während eines Jahres zu vermeiden ist. Tatsächlich war die Fähigkeit zur Bildung von Zitronensäure dabei viel stabiler als bei gewöhnlicher Fortimpfung aus Agarwürze, und zwar bei 4 Stämmen. Wie lange die Sporen ihr Keimungs- und Säurebildungsvermögen behalten, wurde nicht untersucht. Rippel (Göttingen).

Birch-Hirschfeld, L., Die Bedeutung physikalischer Bedingungen bei der Kultur der Entamoeba histolytica. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 361—368.)

Als einfaches und sparsames Züchtungsverfahren für Amöben hat sich die Deckglasmethode erwiesen. Diese ermöglicht vor allem eine fortlaufende Beobachtung der Gesamtkultur und ist daher zur Ermittlung der Wirkung bestimmter Stoffe recht brauchbar. Sie eignet sich weiterhin in besonderer Weise zur Dauerzüchtung (Aufbewahrung in feuchter Kammer), wobei man von schädlichen Stoffwechselprodukten der Begleitbakterien relativ unabhängig ist. Kulturen, die durch die Gegenwart von Buttersäurebildnern gefährdet waren, konnten durch Zusatz von Kalziumkarbonat in Substanz vor dem Eingehen bewahrt werden.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Stelzner, G., Einfacher Nachweis von Hyphen parasitärer Pilze im Halm der Gramineen. (Phytopath. Ztschr. Bd. 8. 1935. S. 368—372.)

Das Verfahren besteht darin, daß aus dem Halm etwa 6½ cm lange Stücke herausgeschnitten werden, die am Ende des unteren Drittels den Knoten enthalten, an dem häufig Hyphen gefunden werden. Nach Evakuieren in absolutem Alkohol wird mit Baumwollblau gefärbt. Möglichst dünne Gewebehäutchen werden dann zur Untersuchung in Glyzerin eingebettet. Zur Untersuchung der Kernverhältnisse wird mit Hämatoxylin gefärbt. Braun (Berlin-Dahlem).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virus-Untersuchungen.

Kingma Boltjes, T. Y., Über Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 188—205.)

Hyphomicrobium vulgare ist zwar seit längerer Zeit bekannt, aber namentlich in seiner Morphologie noch nicht genügend erforscht. Der Organismus kann aus Tropfen langsam tropfender, wenig gebrauchter Wasserhähne auf Natriumformiat-Agar mit Nitrat als Stickstoffquelle isoliert werden. Oft tritt er in Rohkulturen nitrifizierender Bakterien auf; in Nährlösung für Nitritbildner kann er auch angereichert werden. Das hängt damit zusammen, daß er organische Verunreinigungen der Luft als Kohlenstoffquelle auszunutzen vermag. Formiat und Azetat werden gut verwertet, Zucker und Asparagin nicht, hemmen aber auch das Wachstum auf anderen Kohlenstoffquellen nicht.

Die Morphologie wurde in kontinuierlicher Dunkelfeldbeobachtung untersucht. Der Organismus bildet lange, nur im Dunkelfeld, im Hellfeld nur nach Färbung, sichtbare Fäden. Teilung scheint nicht vorzukommen. An den Fäden bilden sich Zellen, die sich ablösen und zu neuen Fäden auskeimen; diese Zellen sind beweglich (polare Geißel). Auf trockenem Substrat scheinen sich diese Zellen auch durch eine Art Sprossung zu vermehren.

Rippel (Göttingen).

Hornbostel, W., Das systematische Verhältnis von Streptobacterium plantarum zu Streptobacterium casei. (Umwandlung von Streptobacterium plantarum in Streptobacterium casei; Streptobacterium casei, eine an Milch und Käse angepaßte Standortsform von Streptobacterium plantarum.) (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 115—155.)

Die von Verf. isolierten Streptobakterien ließen sich in die beiden Gruppen Str. plantarum und Str. casei einordnen. Von ihnen stellt plantarum die ursprünglich auf Blättern und in spontanen Säuerungen vorkommende Stammart dar, casei die an Milch angepaßte Standortsform. Plantarum wächst schlecht in Milch bzw. baut Kasein schlecht ab, casei dagegen gut. Es gelang jedoch, einige plantarum-Stämme an besseren Kaseinabbau zu gewöhnen, eine Eigenschaft, die sie auch bei Weiterzüchtung auf anderem Substrat beibehielten.

Auch die morphologischen Eigenschaften (plantarum = dicke, casei = dünne Zellen) sind nicht konstant. In Milch bildet plantarum dünnere, auf Würzeagar casei dickere Zellen. Auch hier blieb bei einigen plantarum-Stämmen bei Weiterzüchtung in Maische diese morphologische Veränderung konstant. Einige plantarum-Stämme bildeten ferner bei längerer Vorzüchtung in Milch Rechts-Milchsäure, bei Vorzüchtung in Maische die als normal geltende inaktive Säure, sie verhalten sich nach Vorzüchtung in Milch also wie casei-Stämme. Endlich verlieren gewisse plantarum-Stämme bei längerer Züchtung in Milch die Fähigkeit, Pentosen und Polysaccharide zu säuern, nehmen also auch in dieser Hinsicht casei-Eigenschaften an. — Alle diese Beobachtungen führen Verf. zu obigem Schluß.

Rippel (Göttingen).

Kluyver, A. J. und van den Bout, M. T., Notiz über Azotobacter agilis Beijerinck. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 261—263.)

Die Beijerinck sche Originalform Azotobacter agilis scheidet wie A. vinelandii einen grünen, wasserlöslichen Farbstoff aus, so daß sie oft mit dieser verwechselt wurde. Neu isolierte Stämme der Beijerinck schen Form, die sonst mit ihr identisch waren, hatten jedoch kein Farbstoffbildungsvermögen, was Verff. auf unzureichend zusammengesetzte Nährlösungen zurückgeführt hatten. Die Vermutung hat sich nicht bestätigt, da jetzt auch in der Farbstoffbildung mit Beijerincks Form übereinstimmende Stämme isoliert werden konnten. Die frühere Form ohne Farbstoffbildung wird daher als A. agilis var. atypica bezeichnet. Rippel (Göttingen).

Rippel, A., Über die Wirkung von geringen Mengen Agar auf Wachstum und Stickstoffbindung von Azotobacter und auf andere mikrobiologische Vorgänge. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 210—234.)

Zusatz von 0,1% Agar zu einer flüssigen Nährlösung, die bei diesem Zusatz noch flüssig bleibt, übt einen bemerkenswert günstigen Einfluß auf das Wachstum von Mikroorganismen aus, z. B. auf die Glykokoll-Verarbeitung durch ein Darmbakterium und auf Aspergillus. Dieser Pilz wächst auf Bierwürze ohne Agar, anfänglich als Ring am Glasrand, mit Agar von vornherein über die ganze Oberfläche der Flüssigkeit verteilt, so daß hier zweifellos die Erniedrigung der Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine Rolle spielt.

Die Hauptversuche wurden mit Azotobacter durchgeführt. Das bessere Wachstum tritt auch in Nitrat-Nährlösung ein; es handelt sich also nicht um eine Wirkung auf die Stickstoffbindung. Die Wirkung in N-freier Nährlösung ist derart, daß Azotobacter innerhalb 48 Std. bis zu 16 mg Stickstoff auf 1 g Zucker bindet. Die fördernde Wirkung ist nicht Aschenbestandteilen des Agars zuzuschreiben, auch nicht organischen Spurenstoffen, wie Extraktionsversuche zeigten. Es handelt sich vielmehr, abgesehen von der besseren Tragfähigkeit der agarhaltigen Nährlösung, die besseres Oberflächenwachstum gewährleistet, offenbar um eine bessere Sauerstoffversorgung, hervorgerufen durch die Adsorptionseigenschaften des Kolloids. Das tritt vor allem dadurch in Erscheinung, daß das Wachstum bei sofortiger Impfung nach dem Sterilisieren oft schlecht ist, aber gut, wenn die Nährlösung nach dem Sterilisieren bis zur Impfung 1 oder 2 Tage gestanden hat und sich offenbar mit Sauerstoff beladen konnte. Die Beobachtung erklärt, warum sich Azotobacter in dem kolloidreichen Boden bei Zuckerzusatz so schnell vermehren kann.

Es wird darauf hingewiesen, daß ein künftiges Ziel der Mikroorganismenkultur vor allem auch die Herstellung natürlicher, Stoffe mit großer Oberfläche enthaltender, Nährlösungen sein muß. Rippel (Göttingen).

Koblmüller, L. O., Beitrag zur Kenntnis der Wechselbeziehungen zwischen Bakterienvermehrung und Umwelt sowie Bemerkungen über die sog. „Raumtheorie“ Bails. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 687—696.)

Für 12—24 Std. alte, bei 37° auf Nähragar gewachsene Kolonien von Mikrokokken, Bact. pneumoniae Friedländer, Bact. coli und Bac. subtilis gilt der Satz, daß eine Kolonie, die aus n-mal mehr Anfangskeimen entstand als eine gleich alte in gleicher Umwelt entstandene zweite, wenn überhaupt, um weniger als das n-fache größer ist als diese. Mit dem Größerwerden der Kolonie nimmt die Vermehrungsgeschwindigkeit ihrer Keime ab, und zwar schon von der Zeit an, in der die Kolonie für das freie Auge eben erst sichtbar zu werden beginnt. Als Ursache für dieses Absinken der Vermehrungsgeschwindigkeit konnte mit Sicherheit die durch die Lebenstätigkeit der Bakterien hervorgerufene Umweltveränderung (Nährbodenverschlechterung) nachgewiesen werden. Die sog. „Raumtheorie" Bails (wonach von der Zahl der in der Raumeinheit vorhandenen lebenden Bakterien ein ihre Vermehrungsgeschwindigkeit steuernder Einfluß ausgehe) wird deshalb abgelehnt. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Weigmann, F. und Koehn, A., Weitere Untersuchungen über die Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen. I. Mitt. Die entwicklungshemmende bis keimtötende Wirkung des Speichels auf die Diphtheriebazillentypen. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 507—515.)

In Fortsetzung der Untersuchungen von Dold und Weigmann ergab sich, daß die entwicklungshemmende bis keimtötende Wirkung des menschlichen Speichels bei verschiedenen Personen verschieden stark ausgeprägt ist. Weiterhin wurden aber Schwankungen der Wirksamkeit auch bei derselben Person beobachtet.

Kurzdauernde Filtration durch Seitzfilter unter 2 Atm. Überdruck eines indifferenten Gases (N) setzte die Wirkung des Speichels zwar herab, hob sie jedoch bei stark wirksamem Speichel nicht auf.

Die Resistenz der Diphtheriebakterien gegenüber der Speichelwirkung war von der Typenzugehörigkeit unabhängig.

II. Mitteilung. Die Umwandlung der Diphtheriebazillentypen unter der Einwirkung des menschlichen Speichels (S. 516—532).

Unter der Einwirkung des flüssigen, filtrierten, keimfreien Speichels wurden Diphtheriebakterien der 3 Typen (Einzellkulturen) in Formen umgewandelt, die in allen untersuchten Eigenschaften (Bakterienform, Färbbarkeit, Kolonieform, anaerobes Wachstum, Kohlehydratvergärung, Tierpathogenität) den Pseudodiphtheriebakterien vom Hofmann-Typ glichen. Diese Umwandlung ging bei den Typen Intermedius und Mitis direkt vor sich, beim Gravistyp dagegen über einen Zwischentyp, der in allen Eigenschaften dem Intermedius-Typ glich. Es wird deshalb die Ansicht ausgesprochen, daß der Typus Intermedius keinen konstanten Diphtheriebakterien-Typus darstellt, sondern eine Degenerationsform des Typus Gravis, die unter günstigen Bedingungen in die Ursprungsform zurückschlagen kann, unter weiter einwirkender Schädigung (Speichel) dagegen in die Pseudodiphtherieform umgewandelt wird.

Die Umwandlungsstämme zeigten nach ½ jähriger Aufbewahrung und darauffolgender erneuter Überimpfung auf optimale Nährböden (10 Passagen) keinerlei Rückschläge zur Ursprungsform.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Badian, J., Sur la cytologie du Bacillus megatherium. (Acta Soc. Bot. Pol. Vol. 12. p. 69—74. 1935.)

Eine Untersuchung der Zellstruktur dieses Bakteriums führte Verf. zu anderen Schlüssen als Guilliermond. Die Bakterienzelle weist stark lichtbrechende Körnchen, Lipoide auf, die sich mit Sudan und Indophenolblau färben. Sie werden als Reservestoffe auf zuckerhaltigen Nährböden gebildet, dagegen nicht auf Peptonwasser. Durch bestimmte Färbeverfahren können Chromatinstäbchen und Phragmosome sichtbar gemacht werden, wie dies schon bei Bac. subtilis und Bac. mycoides, auch bei Myxomyzeten beobachtet wurde. Die Phragmosome, die in Einzahl in der Zelle vorkommen, sind kugelige Körner oder Lamellen, die sehr widerstandsfähig sind. Von ihnen geht die Bildung einer neuen Zellquerwand aus. Das Bakterium macht einen regelrechten Lebenszyklus durch. Die vegetative Fortpflanzung beginnt mit der Längsteilung des einzigen Chromatinstäbchens, ähnlich wie die Chromosomenteilung. Aus dem Phragmosom bildet sich dann sofort eine neue Scheidewand. Beide Prozesse können zeitlich ineinandergreifen, so daß 4 und mehr Chromatinstäbchen in einer Zelle vorhanden sind. Danach setzt Autogamie ein, das Chromosom teilt sich, beide Hälften stellen sich parallel zur Längsachse der Zelle. Dann nähern sie einander, bilden einen Faden, der sich verkürzt, so daß man echte Chromosomen vor sich zu haben glaubt. Verf. spricht jetzt von der Diplophase. Sind durch Teilungsschritte mehrere Chromatine in einer Zelle entstanden, so degenerieren die überzähligen. Es folgen noch 2 Teilungen, eine erneute Verschmelzung, wieder eine Teilung. Schließlich entsteht um ein end- oder zentralständiges Chromosom eine Vakuole, aus der die Endospore hervorgeht. Damit ist die Diplophase beendet. Überzählige Chromosome und Phragmosom verschwinden. Verf. sieht hierin eine Art Reduktionsvorgang.

Skallau (Berlin).

Schmidt, M., Makrochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Chitin bei Mikroorganismen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 241—260.)

Die bisher in der Literatur vorliegenden Angaben über Chitin, die zum großen Teil mikrochemisch gewonnen waren, sollten makrochemisch nachgeprüft werden. Verschiedene Mucorineen enthielten auf physiologisch neutralen oder schwach alkalischen Nährböden 0,5—1,6% Chitin, auf physiologisch saurem Substrat 4%. Bei der Autolyse nimmt es ab.

Bei Basidiomyceten, bei denen man teilweise, wie bei Polyporus, kein unverändertes Chitin makrochemisch gewinnen konnte, konnte ein reines Produkt erzielt werden.

Oidium lactis und O. aus Erde enthielten 2—3% Chitin, Mycelhefen (Endomyces, Endomycopsis, Eremascus) 0,5—1,5, die letztgenannte auf festem Substrat sogar 5,6%. In Sproßhefen dagegen (Saccharomyces) war kein Chitin nachzuweisen, ebensowenig in Oomyceten (Pythium de Baryanum), Diphtherie- und Tuberkelbakterien.

Das gewonnene Chitin wurde durch Stickstoffgehalt und Überführung in Derivate identifiziert. Die Methode der Chitinbestimmung nach Scholl wurde verbessert durch je einmaliges Kochen des feuchten Myzels mit NaOH und HCl, anschließendes Trocknen und Pulverisieren und Lösen des Pulvers in eisgekühlter HCl mit anschließender Fällung durch Einlaufenlassen in NaOH-Lösung.

Rippel (Göttingen).

Palacios, G. und **Bari, A.**, The physiology of indian nodule bacteria. (Proceed. of the Indian Acad. of Sc. Vol. 3. 1936. p. 334—361.)

Die biochemischen und physiologischen Eigenschaften der Knöllchenbakterien von Cajanus indicus, Dolichos biflorus und Psophocarpus tetragonolobus werden beschrieben. Desgleichen wird eine Methode ausführlich geschildert, mit deren Hilfe die Aufzucht der Leguminosen unter sterilen Bedingungen möglich war und die Knöllchenbildung verfolgt werden konnte.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Palacios, G. und **Bari, A.**, A new microorganism associated with the nodule-bacteria in Cajanus indicus. (Proceed. of the Indian Acad. of Sc. Vol. 3. 1936. p. 362—365.)

Aus den Knöllchen von Cajanus indicus wurde außer den typischen Knöllchenbakterien häufig eine Form isoliert, die diesen kulturell und morphologisch zwar ähnlich ist, aber keine Knöllchen hervorruft. Es wird vermutet, daß dieses Bakterium keine unwesentliche Begleitform an oder in den Knöllchen darstellt, sondern an der Symbiose irgendwie beteiligt ist. Als neue Art erhielt diese Begleitform den Namen Bacillus concomitans.

Bortels (Berlin-Dahlem).

van Niel, C. B., On the metabolism of the Thiorhodaceae. (Archiv f. Mikrobiologie. Vol. 7. 1936. p. 323—358.)

Die Versuche überprüfen vor allem die Anschauung Gaffrons, wonach Thiorhodaceae und Athiorhodaceae sich grundsätzlich dadurch unterscheiden sollen, daß jene Kohlensäure im photochemischen Vorgang nicht wie diese mit organischen Stoffen reduzieren können, sondern lediglich mit oxydierbaren Schwefelverbindungen. Er kommt zu einer Ablehnung dieser Vorstellung. Die Versuche sind mit Chromatium spec. ausgeführt.

Schwefelwasserstoffbildung aus Thiosulfaten oder Sulfaten erfolgt im Dunkeln nicht, sondern nur aus in den Zellen aufgespeichertem Schwefel. Es handelt sich um eine phytochemische Reaktion, nicht um einen normalen physiologischen Vorgang.

Die Manometertechnik kann in Gegenwart von Thiosulfat bei schwefelreichen Zellen zu Trugschlüssen führen, indem anscheinend weniger Kohlensäure assimiliert wird als das tatsächlich der Fall ist. Versuche mit schwefelfreien Zellen zeigten denn auch, daß in Gegenwart von Thiosulfat oder Sulfat und organischen Stoffen Kohlensäure normal assimiliert wird.

Die Tatsache, daß Sulfat nicht im Dunkeln assimiliert wird, aber einen deutlich günstigen Einfluß auf die Kohlensäureassimilation ausübt, erwies sich als eine Verminderung der hemmenden Wirkung der als organische Stoffe verwendeten fettsauren Salze. Der Grund liegt in der bei den Thiorhodaceae (im Vergleich zu den Athiorhodaceae) verhältnismäßig großen Empfindlichkeit gegen freie Säuren. Es werden nämlich sowohl im Licht wie im Dunkeln (also unabhängig vom photosynthetischen Vorgang) von den Thiorhodaceae aus den fettsauren Salzen freie Säuren unbekannter Natur gebildet. Durch die Neutralsalze wird ihre Bildung entweder gehemmt oder die Toleranz des Organismus erhöht.

Verarbeitet werden Essigsäure, Propionsäure, Brenztraubensäure, Milchsäure, Äpfelsäure; Äthylalkohol wird nicht verarbeitet. Freier Wasserstoff

wird ebenfalls verarbeitet, doch ist es fraglich, ob von allen Thiorhodaceae. Freier Sauerstoff wird, im Gegensatz zu Czurdas Meinung im photochemischen Vorgang nicht ausgeschieden.

Die chemische Zusammensetzung der Purpurbakterien zeigt, daß sie mehr reduziert sind als Kohlenhydrate und darin dem Stoff nahekommen, den Gaffron als unmittelbares photochemisches Assimilationsprodukt betrachtet. Rippel (Göttingen).

Skupienski, F. X., Quelques remarques sur Lycogala flavofuscum Rost.. (Acta Soc. Bot. Pol. Vol. 11. p. 553—556. 1934.)

Von diesem selten vorkommenden Myxomyzeten ist bis auf zwei Autoren nie angegeben worden, auf welchem Substrat er in der Natur wächst. Lediglich Jarocki gibt für Polen an, daß er ihn auf Carpinus betulus fand, und Gilbert für Massachusetts, daß er auf Baumstümpfen von Acer rubrum wuchs. Verf. entdeckte die Äthalien auf den toten Zweigen von lebenden Weiden, Apfelbäumen und Acer negundo. L. fl. steht damit in gewissem Gegensatz zu L. epidendrum, der auf den toten Stümpfen von Koniferen vegetiert. Skallau (Berlin).

Krzemieniewska, H., Notes sur quelques myxomycètes nouveaux ou rares en Pologne. (Acta Soc. Bot. Pol. Vol. 11. Suppl. p. 117—136. 1934.)

Von den zur Zeit in Polen bekannten, etwa 180 Arten hat Verf.n 134 eingesammelt und hiervon diejenigen beschrieben, die selten vorkommen oder nur mangelhaft gekennzeichnet waren. Auch neue Formen sind angegeben. U. a. sind aufgeführt: Badhamia versicolor Lister, der für Brandenburg erstmalig von Jahn behandelt wurde, Physarum-Arten, Diderma macrosporum nov. spec., Didymium-Arten, Colloderma dubium n. sp., Stemonitis confluens nov. var. sporangiis liberis u. a. Einige von ihnen waren mit Myxobakterien vergesellschaftet. Skallau (Berlin).

Yamashiro, Moriya, On some Myxomycetes from South Kyûsyû, Japan. (Journ. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B. Div. 2. Vol. 3. 1936. p. 27—36.)

Gelegentlich einer Untersuchung über Vorkommen und Arten von Schleimpilzen im südlichen Teile von Japan fand Verf. eine Reihe neuer Formen, die er beschreibt. Dahin gehören: 1. Badhamia Ainoi n. sp., dessen Plasmodiokarpien auf der Rinde lebender Bäume wachsen, insbesondere auf Diospyros Kaki, daneben auf Camellia, Acer, Populus, Melia u. a. Seine Sporangien sind je nach Ort des Vorkommens verschieden, ob auf Moosen oder Flechten usw. Das Aussehen der Plasmodiokarpien ähnelt denjenigen von Didymium anomalum. — 2. Physarum roseum Berkeley et Broome var. discocephalum var. nov. Er lebt saprophytisch auf Pflanzenmaterial. Verf. fand ihn auf der Rinde von Shiia Sieboldi. Von dem Haupttyp unterscheidet er sich durch die etwas flacheren und genabelten Sporangien. — 3. Physarum roseum Berkeley et Broome var. racemosum var. nov., ebenfalls auf Shiia Sieboldi vorkommend; von dem vorhergehenden Pilz durch seine unregelmäßig gelappten Sporangien abweichend. — 4. Didymium flexuosum sp. n. auf toten Blättern von Cinnamomum Camphora und

Cryptomeria japonica, seltener im Vorkommen; bezüglich der Sporen und Plasmodiokarpien ist er D. quitense und D. trachysporum ähnlich. — 5. Didymium perforatum sp. n., auf Blättern von Camellia und Quercus glauca, D. fulvum und leonium nahestehend. — 6. Stemonitis confluens Cooke et Ellis var. syncarpon var. nov. kommt auf der Rinde von toter Quercus acuta vor und ähnelt St. uvifera. Skallau (Berlin).

Skupienski, F. X., Influence du goudron sur le développement de certains champignons. I. Cladosporium herbarum Link. Phénomènes morphologiques. (Acta Soc. Bot. Polon. Vol. 11. 1934. p. 541—551.)

Während der Pilz bei normaler Ernährung auf einer 4proz. Bierwürzegelose in einer bestimmten Richtung weiterwächst, geht diese Eigenschaft unter dem Einfluß von Steinkohlenteer verloren. Die Zellen teilen sich nicht mehr horizontal, sondern in verschiedenen Richtungen, wodurch Zellhaufen entstehen, die den Wucherungen des tierischen Krebses ähneln. Das Gebilde sieht jetzt schwarz aus, Myzelien und Konidiosporen sind nicht mehr zu beobachten. Die Zellhaufen sind von einer dicken Membran umgeben. Als Ursache des anormalen Wachstums, das nur bei gut genährten Individuen auftritt, nimmt Verf. flüchtige Verbindungen des Teers an, die eine HS-Gruppe führen. Skallau (Berlin).

Schopfer, W. H., Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Recherches sur l'action de divers extraits végétaux sur le développement de Phycomyces. (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 156—176.)

Mit Hilfe von Phycomyces Blakesleeanus untersuchte Verf. 134 Pflanzenarten und fand überall Wachstumssteigerung des Pilzes durch Zugabe von Gewebestückchen, die nach Löslichkeit, Adsorption usw. zweifellos auf Vitamin B 1 zurückzuführen ist, wenn auch möglicherweise noch die Wirkung des Faktors M oder eines anderen hinzukommen könnte. Das Vitamin läßt sich auf gleiche Weise in grünen, aber auch gelben Blättern, in Blütenblättern und in chlorophyllosen Pflanzen (Cuscuta, Orobanche) nachweisen. Rippel (Göttingen).

Steinberg, Robert A., Effects of Barium Salts upon Aspergillus niger, and Their Bearing upon the Sulphur and Zinc Metabolism of the Fungus in an Optimum Solution. (Bot. Gazette. Vol. 97. 1936. p. 666—671.)

Zugabe von Na_2S, Na_2SO_4, H_2SO_4, zu der Fe, Zn, Cu, Mn enthaltenden Nährlösung ergab in allen Fällen Wachstumsvermehrung. Am günstigsten erwies sich dabei Na_2SO_4. Maximale Ernten wurden bei 20 mg S/l erzielt. Es folgte die Kultur mit H_2SO_4-Zusatz, die schon bei 15 mg S/l Höchstwerte an Ernten lieferte, die allerdings etwas niedriger lagen. In beiden Maximalfällen betrug der p_H-Wert in beiden Lösungen — in der Erntezeit 1,78! bzw. 1,82! Nur gering war der Einfluß von Na_2S, den Verf. auch noch darauf zurückführt, daß in der Lösung das Sulfid zu Sulfat oxydiert wird; offenbar ist der Pilz gar nicht imstande, Sulfide als solche zu verwerten. Zwischen dem p_H-Wert der Nährlösung zur Zeit der Ernte und den Erträgen zu dieser Zeit bestehen Parallelen, die Sporulation schließt sich an. Das gilt für die

H_2SO_4- und Na_2SO_4-Kultur, wohingegen die Sulfidkultur bezüglich der Sporenbildung und Erträge stete Zunahme bei fallendem p_H-Wert zeigte. S-Mangel rief die Bildung untergetauchter, schleimiger und durchscheinender Hyphen hervor; bei stetig abnehmendem S-Gehalt der Lösung ist die Sporulation zunächst verstärkt, um bei weiterem Sinken des S-Gehaltes ebenfalls nachzulassen. Bei Abwesenheit setzt sie gänzlich aus. Geringe Gaben von $BaCl_2$ — 0,1—0,2 g/l — bewirkten zunächst Erhöhung der Ernten und Anstieg des p_H-Wertes, ausgenommen bei der Sulfidkultur. Größere Mengen — 0,3 g und mehr — veranlaßten Rückgang der Ernten und vermehrte Sporenbildung. Wird die Ba-Gabe so groß, daß aller Schwefel ausgefällt wird, so bekam die Kultur ein Aussehen, das sich in nichts mehr von einer Zn-, Fe- oder Cu-Mangelkultur unterschied. Verf. bot dem Pilz auch organische S-Verbindungen wie Cystin. Es zeigte sich, daß Asp. nig. selbst bei Gegenwart von Ba-Salzen sehr wohl in der Lage ist, derart gebundenen Schwefel zu assimilieren. Nach seiner Ansicht beruht der Ba-Effekt in der Entfernung des S aus dem Kulturmedium durch Ausfällung. Unter Hinweis auf die Parallelität zwischen S- und anderen Metallmangelkulturen betont Verf., daß die Normal- (Kontroll- oder Minus-) Kulturen eigentlich die anormalen seien und umgekehrt. Skallau (Berlin).

Lund, A., Über die Wirkung des Follikel-Hormons auf das Wachstum einiger Mikroorganismen. (C. R. Lab. Carlsb., Sér. physiol. Vol. 21. 1936. p. 231—238.)

Im Hinblick auf die widerstreitenden Ergebnisse, die bis heute über eine Wirkung des Progynons auf pflanzliche Organismen, insbesondere auf höhere Pflanzen, vorliegen, untersuchte Verf. die Beeinflussung des Wachstums von Aspergillus niger und Saccharomyces cerevisiae durch technisches und reines, kristallisiertes Progynon. Die Trockensubstanzproduktion beider Pilze jedoch erfuhr durch eine Beigabe beider Follikuline weder eine Vermehrung, noch eine Verminderung, so daß von einem Einfluß dieses Hormons nicht die Rede sein kann. Skallau (Berlin).

Nielsen, N., Untersuchungen über die Stickstoffassimilation der Hefe. V. Untersuchungen über die Fähigkeit der Hefe, koagulierbaren Stickstoff auszuscheiden. (C. R. Carlsb., Sér. physiol. Vol. 21. 1936. p. 205—218.)

Pilsnerwürze wurde durch halbstündiges Erhitzen auf 125° C vom koagulierbaren N, bis auf etwa 10%, befreit. Die Hefe scheidet in solcher Würze weder während des Wachstums, noch während der darauffolgenden Autolyse durch Hitze fällbaren N aus. Eine Verschiebung der H-Ionenkonzentration im Bereich von 4,2—5,5 ist ohne Einfluß. Versuche auf synthetischem Nährboden bestätigten diesen Befund. Auch die in der Praxis angestellten Ermittelungen ergaben, daß bei Gärung und Lagerung des Bieres eine Abscheidung von koagulierbarem N nicht statthat, daß dagegen beträchtliche Mengen nicht durch Hitze fällbaren Stickstoffes nachgewiesen werden konnten. Um was für Verbindungen es sich in diesem Falle handelt, soll durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Skallau (Berlin).

Nielsen, N. und Lund, A., Untersuchungen über die Stickstoffassimilation der Hefe. VI. Untersuchungen

über die Assimilation der formoltitrierbaren Stickstoffverbindungen der Bierwürze. (C. R. Lab. Carlsb., Sér. physiol. Vol. 21. 1936. p. 239—246.)

Es zeigte sich, daß nicht der gesamte formoltitrierbare N von Hefe assimiliert wird, bestenfalls 70% in verdünnter Pilsnerwürze, vom nicht formoltitrierbaren N höchstens 45%. Gleichzeitig war eine bevorzugte Aufnahme des Formol-N gegenüber dem Gesamt-N festzustellen. In unverdünnter Würze nimmt die Hefe etwa 50—56% des Formol-N auf. Bei der Autolyse wird dieser N in größeren Mengen wieder ausgeschieden. Die Ergebnisse der Laborversuche wurden durch Zahlen aus der Praxis bestätigt.

Skallau (Berlin).

Nielsen, N., Untersuchungen über die Stickstoffassimilation der Hefe. VII. Untersuchungen über das Vermögen der Hefe, Aminosäuren zu assimilieren. (C. R. Lab. Carlsb., Sér. physiol. Vol. 21. 1936. p. 395—424.)

Es wurden 27 verschiedene Aminosäuren auf ihre Assimilation durch Saccharomyces cerevisiae untersucht. Methodisch ergab sich dabei, daß man die Bestimmung des Wachstums nicht als Maßstab für die Assimilation anwenden darf. Als solcher kann nur die direkte N-Bestimmung dienen. Ferner ist unbedingt eine Zugabe von Wuchsstoff erforderlich. Die Aufnahme einer Aminosäure durch die Hefe ist von der Stellung der NH_2Gruppe im Molekül abhängig. Bevorzugt assimiliert werden die optisch aktiven Formen der α-Aminoverbindungen; es folgen die Razemverbindungen. Das gilt für Glykokoll, Alanin, Serin, Phenylalanin, Tyrosin usw. Weiter spielt für diese Gruppe die Länge der C-Kette eine Rolle. Glutaminsäure und Ornithin werden noch aufgenommen, allerdings nicht mehr so vollständig wie die Moleküle mit niedrigeren C-Zahlen. Aminoadipinsäure, Diaminoadipinsäure, Diaminopimelinsäure werden nicht mehr verwertet. Die Grenze der Aufnahmemöglichkeit scheint also zwischen dem 5. und 6. C-Atom zu liegen. Bei ringförmigen Verbindungen wird nur der N der Seitenkette verarbeitet, wie dies die Beispiele für Tryptophan und Histidin zeigen. Bei den Verbindungen mit langer C-Kette liegt keine Giftwirkung vor, in ihrer Gegenwart wird $(NH_4)_2SO_4$ assimiliert. β- und γ-Verbindungen wie β-Alanin und γ-Aminopropylmalonsäure werden nicht angenommen. Der δ-Verbindungstyp wird nur schwer verarbeitet, möglicherweise finden intramolekulare Umwandlungen statt, die dann von der Hefe besser angegriffen werden können. ε-Verbindungen dagegen scheinen wieder gar nicht als N-Lieferanten in Frage zu kommen, allerdings hat Verf. durch die Verwendung des Lysins hierfür keinen eindeutigen Beweis geliefert, da es sich um eine C-Verbindung mit 6 C-Atomen handelt, die an sich schon nicht assimiliert werden kann.

Skallau (Berlin).

Nielsen, N., Untersuchungen über Hefewuchsstoff. (C. R. Lab. Carlsb., Sér. physiol. Vol. 21. No. 7. 1935. p. 151—182.)

Verf. untersuchte die Fragen nach der Bildung von Bios (Wuchsstoff B) durch die Hefe und der unbedingten Notwendigkeit für ihr Wachstum. Saccharomyces cerevisiae wurde auf synthetischem Medium gezüchtet, als Wuchsstoffquellen kamen Pilsnerwürze mit 10,7% Balling und Hefeextrakte zur Verwendung. F, das Verhältnis von Trockensubstanz T der Versuchshefe zu T der Kontrollhefe (als Maß für die Wuchsstoffwirkung gewählt) und der Vermehrungsquotient sind stark von Zeit, Temperatur, Impfmenge und Wuchsstoffgehalt der Impfhefe abhängig. Die Impfhefe muß auf einem synthetischen, 1% Würze enthaltenden Nährboden während längerer Zeit gezüchtet werden. Die Impfmenge ist so niedrig wie möglich zu nehmen. Verf. konnte eindeutig feststellen, daß die Hefe auf wuchsstofffreien Nährböden nicht wächst, Wuchsstoff B also unbedingt für das Wachstum der Hefe erforderlich ist. — Zunehmende Gaben von Hefeextrakt und Würze bewirkten ein steiles Ansteigen des Wachstums, wobei der Extrakt erst seine volle Wirkung entfaltete, wenn Würze zugegen war. Die Wuchs-

stoffmenge der Hefe nahm mit steigenden Gaben beider zu, ferner in dem Maße, wie der Biosgehalt im Nährsubstrat abnahm. Verf. schließt daraus, daß die Hefe selber nicht imstande ist, Bios zu bilden. Offen bleibt noch die Frage, ob es sich beim Hefeextrakt und der Würze um den oder die gleichen Wuchsstoffe handelt, möglicherweise kommen Begleitstoffe vor, die Unterschiede vortäuschen. Der Wuchsstoff läßt sich durch kurzes Aufkochen wahrscheinlich quantitativ mit Wasser extrahieren, falls nicht mehr als 150 mg Hefetrockensubstanz/cm^3 Aufschlämmung vorliegen. Die Hefe verbraucht einen Teil des aufgenommenen Wuchsstoffes für sich, wie aus den Versuchen über die Wechselwirkungen zwischen Würze und Hefeextrakt hervorgeht.

Skallau (Berlin).

Olenov, J. M., On the factors influencing the struggle for life between races of the yeast species Zygosaccharomyces mandshuricus. (Archiv f. Mikrobiologie. Vol. 7. 1936. p. 264—285.)

Durch Radiumemanation gewonnene Rassen von Zygosaccharomyces mandshuricns vermögen in Mischkultur mit der Ausgangsrasse diese zu unterdrücken, auch in einer Nährlösung mit Kohlenhydraten, die von beiden gleich gut vergoren werden. Erhöhung der Temperatur von 12—14 auf 24° C erhöht diese Eigenschaft, während Austrocknung die Ausgangsrasse fördert, weil diese, im Gegensatz zur neuen Rasse sporuliert. Die neue Rasse vermag auch die Ausgangsrasse zu unterdrücken, wenn diese bereits vorgewachsen war, also Stoffwechselprodukte gebildet hat. Auch in Riesenkolonien mit Mischung beider Rassen dominiert die neue Rasse. Eine andere neue Rasse wirkt nicht ganz so kräftig auf die Ausgangsrasse.

Jedenfalls zeigt sich eine künstlich erzielte Rasse im Kampf ums Dasein u. U. der Ausgangsrasse überlegen, so daß die Änderung durchaus vorteilhaft sein kann.

Rippel (Göttingen).

Gistl, R., Zur Physiologie des „Echten Hausschwammes" (Merulius lacrymans domesticus Falck). (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 177—187.)

Als Substrat wurde Weizenkleie benutzt. Geerntet wurde indessen nur das über der Kleie aufgewachsene Myzel. Für Merulius lacrymans stellt Nitrat eine weitaus bessere Stickstoffquelle dar als Ammonsalze; die beste Ernte lag bei 0,3 mol Nitrat; Sulfate fördern auch in hohen Konzentrationen (0,5 mol.). Phosphate verursachen starkes Längenwachstum. Kalziumsalze wirken bis 0,3 mol stark wachstumsfördernd, Magnesiumsalze fördern bis zu 0,1 mol.

Der Hausschwamm bildet, bei Prüfung der Vermehrung von Hefe, besonders viel Wuchsstoffe (Zellvermehrungswuchsstoffe, Auxanone nach Boas). Mit wäßrigem Auszug ergab sich eine Hefevermehrung auf das 3300fache der Kontrollen, während die bisher höchste von Boas mit Pflanzenauszügen gefundene Zahl das 1200fache betrug.

Rippel (Göttingen).

Doerr, R., Allgemeine Merkmale der Virusarten. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 738—747.)

Scharfe Ablehnung der Auffassung, daß die sog. Virusarten eine biologisch einheitliche Gruppe von Infektionsstoffen repräsentieren.

Es wird eine Reihe von Argumenten angeführt, die für die unbelebte Natur bestimmter Virusarten sprechen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Herzberg, K., Über die färberische Darstellung einiger Virusarten (Elementarkörperchen) unter besonderer Berücksichtigung der intracellulären Vermehrungsvorgänge. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 15. 1936. S. 1385—1389.)

Die Elementarkörperchen sind die Erreger der Viruskrankheiten. Jeder Virusart gehören bestimmte Elementarkörperchen an. Ein Teil von ihnen läßt sich färberisch sichtbar machen (am besten geeignet hat sich Viktoriablau erwiesen). Da sich die Elementarkörperchen eines Virus gleich groß und gleich dunkel färben, können verschiedene Vira nach Farbtiefe und Größe ihrer Elementarkörperchen unterschieden werden. Die Elementarkörperchen vermehren sich durch Zweiteilung. Zwischen den verschiedenen Virusarten bestehen in der Art der Vermehrung charakteristische Unterschiede, die durch Vermehrung im Plasma oder Vermehrung in Vakuolen gekennzeichnet sind.

Die sog. „Einschlußkörperchen" bestehen offenbar aus kleineren Gruppen von Elementarkörperchen, die von einer stark färbbaren Abscheidung (der Zelle oder des Virus?) mehr oder weniger reichlich umhüllt sind.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Chester, K. S., Serological tests with Stanleys crystalline Tobaccomosaic protein. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 715.)

Von Stanley ist unlängst aus mosaikkrankem Tabak ein Protein in Kristallform gewonnen worden, das die gleichen pathogenen Eigenschaften wie das Mosaikvirus aufweist. Verf. berichtet über serologische Untersuchungen mit dieser Substanz, deren Verhalten gegenüber der Praezipitinreaktion, der Anaphylaxiereaktion und der Komplementbindung er prüfte. Er gelangt dabei zu folgenden Vorstellungen: Der aus einer mosaikkranken Tabakpflanze ausgepreßte Saft enthält zwei Gruppen von Antigenen, nämlich a) einen Komplex von Proteinen, die auch in der gesunden Pflanze enthalten sind und b) das eigentliche Virus-Antigen. Die Versuche ergaben keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß etwa noch eine dritte Gruppe im Spiel sein könnte. Das Virus des Tabakmosaiks ist nun ebenso wie verschiedene andere den Tabak angreifende Vira sehr stark praezipitinogen zum Unterschied von den Antigenen der a-Gruppe, die nur durch eine sehr schwache Praezipitinreaktion charakterisiert sind. Daher eignet sich auch diese Reaktion besonders gut zum Nachweis des Virus-Antigens, nicht jedoch zum Nachweis der a-Gruppe. Mit Hilfe der Anaphylaxiereaktion (Methode Schultz-Dale) lassen sich zwar die a-Antigene nachweisen, nicht jedoch das Virus-Antigen. Dieses Versagen ist möglicherweise damit zu erklären, daß das Virus infolge seines hohen Molekulargewichts (von Stanley auf einige Millionen geschätzt) an der freien Diffusion in den isolierten Meerschweinchenmuskel gehindert ist. Aus den Ergebnissen der Anaphylaxie- und der Komplementbindungsversuche ist zu folgern, daß die Stanleyschen Kristalle das Virus nicht in reiner Form enthalten, sondern daß noch andere Proteine darin als Beimengungen enthalten sind. Wenn sich auch zur Zeit über den Anteil dieser Beimengungen noch keine Angaben machen lassen, so ist doch sicher, daß die Kristalle große Mengen des eigentlichen Virusproteins enthalten. — Die Arbeit bringt weitere wertvolle Ergebnisse, worüber im Original nachgelesen werden muß.

E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Albers, H., Wesen und Wirkung der Fermente. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 448—455.)

Verf. bespricht Fermenttheorien; Cofermente, Aktivatoren und Komplemente; Wesen und Wirkung der Cofermente und Apofermente; die Abtrennung von Cofermenten und schließlich die Frage der Fermentmodellversuche und der Zwischenverbindungen. Heuß (Berlin).

Fischer, F. G., Die enzymatische Hydrierung ungesättigter Verbindungen. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 559—560.)

Unter der Einwirkung gärender Hefe lagern ungesättigte Ketosäuren, ungesättigte Ketone und Aldehyde ebenso wie ungesättigte primäre Alkohole Wasserstoff an die Äthylenbindung an. Es werden nur Doppelbindungen hydriert, die zum Carbonyl oder Hydroxyl α, β-ständig sind, nicht aber entferntere Bindungen. Gleichartige Hydrierungen konnten nun auch mit Fermentlösungen aus Hefe durchgeführt werden. Die Anwesenheit von „gelbem Ferment" ist dazu erforderlich: die Anlagerung von Wasserstoff an die Äthylenbindung erfolgt über die hydrierte Stufe des „gelben Ferments".

Heuß (Berlin).

Weidenhagen, R., Beziehungen zwischen Vitamin C und enzymatischen Kohlenhydratspaltungen. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 470—471.)

Zwischen Vitamin C und der Tätigkeit zuckerspaltender Enzyme bestehen enge Beziehungen. So wird die rohrzuckerspaltende β-h-Fruktosidase durch Ascorbinsäure in physiologischer Konzentration stark gehemmt. Durch eine Reihe von Stoffen, wie Aminosäuren, besonders aber durch SH-Verbindungen von Glutathion, kann diese Hemmung wieder aufgehoben werden. Bei Anwendung hochgereinigter Enzympräparate ohne reaktivierende Verunreinigungen wird der Zeitwert für die 50proz. Spaltung der Saccharose durch eine bestimmte Menge Vitamin um einen ganz konstanten Betrag heraufgesetzt. Auf diese Weise lassen sich bereits Spuren Verunreinigungen vom Charakter der Reaktivierungsstoffe im Vitamin nachweisen, da diese den Hemmungseffekt herabsetzen. Die β-Glukosidase des Emulsins wird durch das Vitamin gleichfalls gehemmt, wenn ausreichend gereinigte Fermentpräparate verwendet werden. Der enzymatische Stärkeabbau erfährt durch das Vitamin gleichfalls eine starke Hemmung. Die β-Amylasewirkung von Weizen und Gerste wird stark gestört, das gleiche gilt für tierische Pankreasamylase und die gemischte Amylase des Malzes, so daß sich die beiden Typen der Amylase gegenüber dem Vitamin gleichartig verhalten. Wo bisher keine Hemmung durch das Vitamin beobachtet werden konnte, beispielsweise bei der α-Glukosidase aus Hefe oder Leberamylase, war stets die Anwesenheit reaktivierender Verunreinigungen die Ursache. Heuß (Berlin).

Bredereck, H., Nucleinsäuren. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 553—554.)

Das Vitamin B_2 (Lactoflavin), das Cytoflav und das gelbe Ferment unterscheiden sich von echten Nucleinsäure-Derivaten lediglich durch das Fehlen der Zuckersauerstoffbrücke. Die Vorstufe des Lactoflavins ist zweifellos ein echtes Nucleosid. Das Coferment der alkoholischen und der Milchsäuregärung stellen Nucleinsäure-Derivate dar. Den Nucleinsäuren kommt

jedenfalls eine entscheidende biologische Bedeutung zu. Die chemische Konstitution der einfachen Nucleinsäuren, der Mononucleotide ist sichergestellt. Für die Polynucleotide, zu denen u. a. die Hefenucleinsäure gehört, konnte durch fermentchemische Versuche gezeigt werden, daß die Verknüpfung der Mononucleotide jeweils über die Phosphorsäuregruppe verläuft.

Heuß (Berlin).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Perelomow, J., Die Mikroflora der kondensierten Milch. (Die Milchindustrie UdSSR. Nr. 2. 1936. S. 35—37.) [Russisch.]

Die Untersuchung mehrerer hundert Proben von kondensierter Milch ergab folgende Bakterienmengen (in 1 g Milch): 100—1000 Stück in 82% der untersuchten Fälle, 1000—10 000 in 15,8%, 10 000—50 000 in 2,2%, über 50 000 in 0% der untersuchten Fälle. Im Durchschnitt stellte sich die Bakterienmenge in 1 g kondensierter Milch auf 1047 Stück. Die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora war folgende (in Klammern ist die Zahl der Bakterien in 1 g Milch angeführt): Hefe (45), Coli aerogenes (5, 8), Buttersäurebakterien (16), Milchsäurebakterien (—).

M. Gordienko (Berlin).

Bradfield, A., and Ellenberger, H. B., Modified medium and incubation temperatures as they affect bacteria counts of milk containing organisms arising from various sources of contamination. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 491—493.)

Es wurde nachgeprüft, welche Änderungen im Endergebnis der Plattenkeimzählung auftreten, wenn anstatt des Standardverfahrens auch andere Methoden durchgeführt werden und wenn die Art und Weise der Milchinfektion ebenfalls wechselt. Was die verschiedenen Verfahren betrifft, so wurde neben dem Standardagar auch noch der Trypton-Glukose-Magermilchagar nach Bowers und Hucker verwendet unter gleichzeitiger Anwendung von Bebrütungstemperaturen von 32 und 37° C während 2 Tagen. Auch wurden verschiedene Typen von Magermilchpulvern daraufhin geprüft, ob sie geeignet sind, im Trypton-Glukose-Magermilchagar die Magermilch zu ersetzen. — Die Bebrütungstemperatur von 32° hatte bei gewöhnlich infizierter roher und pasteurisierter Milch auf die Erhöhung der Kolonienzahl einen größeren Einfluß als der Wechsel des Nährbodens (Tryptonagar). Die Verbindung des Tryptonagars mit der Bebrütung bei 32° gab in den meisten Fällen die höchsten Kolonienzahlen. Der Tryptonagar erhöhte überdies speziell die Keimzahlergebnisse mit pasteurisierter Milch. Milch, die stark von den Geräten her verunreinigt oder die unsachgemäß gekühlt worden war, ergab in allen Fällen mit dem Tryptonagar bei 32° C die höchsten Keimzahlen. Es ist bemerkenswert, daß jedoch der Standardagar bei 37° C genau so viel Kolonien auswachsen ließ, als irgendeine der anderen Kombinationen, wenn eine Milch verarbeitet wurde, die nur wenig Keime enthielt oder nur solche Keime, die direkt aus dem Euter stammen. Bei Milch, die durch Kontaktinfektion mit dem Kuhkörper infiziert worden war, zeigten sich bei den verschiedenen Verfahren keine besonderen Unterschiede, die Kuhkotinfektion ließ mit dem Standardnährboden bei 37° etwas höhere Zahlen auftreten. Bei Verunreinigung der Milch mit Streu, Staub und Futter hatte die Anwendung der 32°-Temperatur einen stärkeren Einfluß auf die Erhöhung der Kolonienzahl als der

Tryptonagar. Dieser besaß jedoch einige Vorteile bei 32° C, nicht aber bei 37° C. — Ganz allgemein betrachtet, waren die auf dem Tryptonagar ausgewachsenen Kolonien größer und leichter erkennbar als diejenigen auf dem Standardagar, eine Tatsache, die wesentlich zum genauen Zählen beitrug. Was die Brauchbarkeit von Magermilchpulvern an Stelle frischer Magermilch als Zusatz zum Trypton-Glukose-Agar betrifft, so konnten zwar keine prinzipiellen Unterschiede gefunden werden, es ergaben sich mitunter nur Schwierigkeiten, die rekonstruierte Trockenmilch im Nährboden gleichmäßig zu verteilen. — Alles in allem geht aus den Untersuchungen hervor, daß der Trypton-Glukose-Magermilchagar bei der Bebrütungstemperatur von 32° bei der bakteriologischen Milchkontrolle besser brauchbar ist als der Standardagar bei 37° C. Die gefundenen Besonderheiten deuten darauf hin, daß die neue Methode geeignet ist, speziell unsauber gewonnene und schlecht behandelte Milch herauszustellen, während die Milchen bester Qualität durch das neue Verfahren im Vergleich zur Standardmethode keine schlechtere Beurteilung erfahren. Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Yawger jr., E. S., and Sherman, J. M., Streptococcus lactis in raw and pasteurized milks of very high quality. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 494.)

Es ist eine bekannte Erfahrung, daß sich Streptococcus lactis selten aus frischer oder sehr keimarmer Milch isolieren läßt und daß solche Milchen wegen ihres Mangels an Milchsäurebildnern bei Aufbewahrungstemperaturen von 20° C und höher eine anormale Gärung zeigen. In vermehrtem Maße ist dies der Fall, wenn solche Milchen auch noch pasteurisiert werden. An Hand geeigneter Anreicherungsmethoden konnten Verff. feststellen, daß in Rohmilchen mit weniger als 10 000 Keimen der Streptococcus lactis in der Regel nur in Mengen von 10—100 Individuen pro Kubikzentimeter vorkommt. In pasteurisierten Milchen derselben Qualität, die meist weniger als 100 lebende Bakterien pro Kubikzentimeter besaßen, konnte der Streptococcus lactis in der Regel nur in der Einzahl pro Kubikzentimeter Milch nachgewiesen werden.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Foote, F. M., Welch, H., West, D. E., and Borkman, E. K., Incidence and significance of Beta hemolytic streptococci in cultures from a selected group of milk handlers. (Amer. Journ. of Public Health. Vol. 26. 1936. p. 799—806.)

Was zunächst die Gewinnung der Kulturen betrifft, so hat sich Schafblutagar (p_H 6,6—7,0) oder Neopepton-Savita-Kaninchenblutagar (p_H 7,4—7,6) als sehr wirksam erwiesen. Es zeigte sich als unbedingt notwendig, zwischen der Entnahme der Proben aus Rachen und Nase und der Untersuchung im Laboratorium keine allzu lange Zeit verstreichen zu lassen. In bezug auf das Problem der Milchinfektion durch Personen von durchschnittlicher Gesundheit läßt sich auf Grund der Untersuchung von 85 Personen folgendes aussagen: 1. Die klinische Untersuchung allein ist ungenügend, um alle Beta-Streptokokkenträger ausfindig zu machen. 2. Die laufende Laboratoriumsuntersuchung ist ebenfalls ungeeignet, weil sie in der Praxis nicht so häufig durchgeführt werden kann, als es notwendig wäre. 3. Beta-hämolytische Streptokokken können Austrocknen und andere schädliche Einflüsse nicht in einer Weise überleben, als daß ihr Nachweis in einem örtlich entfernten Laboratorium mit einer

wünschenswerten Genauigkeit durchgeführt werden könnte. 4. Falls genügende Keime in die Milch gelangen — mögen diese von zeitweisen Ausscheidern oder von Dauerausscheidern herrühren — so sind diese als potentiell pathogen aufzufassen. 5. Der Prozentsatz an Personen, die diese Keime mit sich führen, ist zu groß, als daß es möglich wäre, die Ausscheider durch praktische Maßnahmen vom Milchhandel auszuschließen. 6. Da sich bei der großen Menge der Ausscheider keine engeren Beziehungen zu der Häufigkeit des Auftretens von eitriger Halsentzündung infolge Milchgenusses auffinden ließen, ist anzunehmen, daß Epidemien nur vorkommen, wenn eine verhältnismäßig große Menge Keime die Milch auf dem Umwege über eine Euterinvasion infiziert oder, was wahrscheinlich weniger häufig ist, auf einem anderen Wege. 7. Die Konsumenten müssen gegen eitrige Halsentzündung infolge Milchgenusses durch andere Mittel geschützt werden, als es die periodisch durchgeführte klinische und laboratoriumsmäßige Überwachung ist.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Manus, L. J., and Thurston, L. M., Study of the causes of bitter flavor in cream. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 484—485.)

Es gelang, aus bitterem Rahm Bakterien zu isolieren, die in der Lage sind, bei tieferen Temperaturen außerordentlich bitteren Geschmack zu erzeugen. Die Tatsache, daß normalerweise in der Praxis, hauptsächlich im Winter bei niedrigen Temperaturen, bitterer Rahm angeliefert wird, deutet darauf hin, daß die meisten dieser Fälle durch Vertreter der gefundenen Bakterientypen verursacht werden dürften. 2 der Kulturen, sporenbildende Stäbchen, führten unter Alkalisierung einen raschen Eiweißabbau der Milch herbei. Ein weiterer Sporenbildner brachte die Milch unter starker Säurebildung zur Gerinnung unter langsam nachfolgender, schwacher Proteolyse. Da fettspaltende Eigenschaften nicht beobachtet werden konnten, dürfte die Ursache des bitteren Geschmackes ein Nebenprodukt des Eiweißabbaues sein. 2 Kokkenkulturen hingegen, die Spuren von Bitterkeit erzeugten, waren Fettspalter, ohne jedoch Eiweiß abzubauen. In weiteren Versuchen wurden 50 Proben bitteren Rahmes mit Formalin behandelt, um Bakterienwachstum zu verhindern. Es konnte beobachtet werden, daß darin Lipasen in genügenden Mengen vorhanden waren, um eine merkliche Erhöhung der Azidität zu verursachen. Eigenartigerweise trat jedoch keine Ranzigkeit auf, woraus sich schließen läßt, daß die Lipase entweder durch die Säurebildung gehemmt wurde oder daß sie andere Geschmacksveränderungen verursachte. Ganz allgemein ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Absonderung originärer Milchlipase durch die Milchdrüse Bitterkeit in Rahm verursacht, als sehr gering zu betrachten. Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Parfitt, E. H., Frequency of the Escherichia-Aerobacter species in commercial butter. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 496—497.)

Verf. hat über 1000 Proben aus 60 verschiedenen Molkereien auf ihre bakteriologische Qualität mit besonderer Berücksichtigung der Coli aerogenes-Gruppe untersucht. Diese wurde jeweils durch Verimpfung von $^1/_{10}$ ccm Butter in Natriumformiat-Ricinoleat-Bouillon nach Stark festgestellt. Ergebnisse: Bei rund 17% der Proben zeigte sich Gasentwicklung, bei 11% davon konnten Coli, bei 5,4% Aerogenes und bei 1,4% Zwischenformen nachgewiesen werden. Von 50 Buttereien, die 12 oder mehr Proben

eingeschickt hatten, waren es 8, deren Butter niemals eine Gasbildung auftreten ließ. Der höchste Prozentsatz an positiven Proben wurde im Juli und August 1935 gefunden mit 30,8% der Gesamtproben und die niedrigsten Prozentsätze im Januar 1936 mit 3,47%. Irgendwelche Beziehungen zwischen der Pilz- und Hefekeimzahl und der Anwesenheit von Coli-Organismen in Butter oder zwischen der Haltbarkeit der Butter und dem Freisein von Coli aerogenes-Organismen konnten nicht gefunden werden.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Lane, C. B., The effect of certain Penicillia on the volatile acidity and the flavor of Jowa blue cheese (Roquefort-type). (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 498—499.)

Der charakteristische Pfeffergeschmack des echten Roquefortkäses wird zum größten Teil durch das Auftreten gewisser Fettsäuren während des Käsereifungsprozesses hervorgerufen. Es ist anzunehmen, daß bestimmte Penicillium-Stämme Unterschiede bezüglich der fettspaltenden Eigenschaften besitzen und daß der eine Stamm besser brauchbar und der andere weniger brauchbar ist. Bei Klärung dieser Fragen an Hand von 8 verschiedenen Kulturen zeigte sich folgendes: Bei sämtlichen Käsen war mit dem Fortgang der Reifung auch ein Anwachsen der gesamten flüchtigen Säuren zu beobachten. Während die verschiedenen Käse jedoch große Unterschiede in der Menge der gebildeten flüchtigen Säuren zeigten, waren in der Art der vorhandenen flüchtigen Säuren keine größeren Unterschiede zu beobachten. In den älteren Käsen konnte ein größerer Prozentsatz von höher-molekularen Fettsäuren gefunden werden als in den jüngeren Käsen, ohne daß bei den verschiedenen Stämmen diesbezüglich wesentliche Unterschiede zu beobachten waren. Bezüglich des Aromas jedoch konnten große Unterschiede bei den einzelnen Stämmen festgestellt werden. Gewisse Stämme erzeugten im Käse den charakteristischen Pfeffergeschmack des typischen Roquefort in verhältnismäßig kurzer Zeit, während Käse mit anderen Stämmen mitunter nicht bloß des Aromas entbehrten, sondern sogar fehlerhaften Geschmack besaßen. Solche Käse, die verhältnismäßig große Mengen flüchtiger Säuren besaßen, hatten auch viel von dem scharfen Pfeffer-Aroma, während Käse mit geringen Mengen flüchtiger Säuren in der Regel kein Aroma aufwiesen. Ein Stamm schien, vom Standpunkt der Käsereifung aus betrachtet, allen anderen überlegen.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Korolew, A. N., Wlasow, A. I. und Babkina, S. A., Die Wirkung der Fütterung der Milchkühe mit Kleesilage (vom 2. Schnitt) auf die Käsequalität. (Arb. d. Inst. f. Milchwirtschaft zu Wologda. Bulletin Nr. 81. S. 121—137.) [Russisch.]

Es wurde festgestellt, daß bei der Fütterung der Milchkühe mit Kleesilage (vom 2. Schnitt) der Bakteriengehalt der Milch geringer und ihre Aufbewahrungsfähigkeit höher waren als bei der Fütterung mit Rationen ohne Silage. Die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora der Milch der mit und ohne Silage gefütterten Tiere war die gleiche (mikroskopische Untersuchung): in den beiden Milchproben dominierten anfänglich Mikrokokken, später aber (nach 12stündiger Aufbewahrung der Milch) waren Streptococcus lactis u. a. festzustellen; die Zahl der Stäbchen betrug (nach der Aufbewahrung) in Milchproben von den mit Silage gefütterten Tieren 5 990 000, und in denen ohne Silage gefütterten 6 200 000 in 1 ccm. Die ersteren Milchproben brauchten eine bedeutend längere Zeit zum Sauerwerden.

Die Qualität des aus den beiden Milchproben hergestellten (harten) Käses war die gleiche. M. Gordienko (Berlin).

Stockmayer, W., Untersuchungen über die Bangbakterieninfektion des Euters, über den Verlauf der Ausscheidung der Bangbakterien und ihre Feststellung. (Arb. aus dem Reichsgesundheitsamte. Bd. 70. 1936. S. 167—198.)

Kühe, die an einer Bangbakterieninfektion des Euters leiden, scheiden dauernd oder zeitweilig in einem sich wiederholenden Turnus Bangbakterien mit der Milch aus. Die Ausscheidung beginnt nach der ersten wie auch nach der zweiten Geburt meist mit dem Einsetzen der Laktation oder in den folgenden Tagen. Die Zahl der ausgeschiedenen Bangbakterien ist zu dieser Zeit am größten.

Grad und Dauer der Ausscheidung ist bei den einzelnen Kühen sehr verschieden. Nach Normalgeburten können ebenso viel Bakterien ausgeschieden werden wie nach Aborten. Im allgemeinen nimmt die Zahl der ausgeschiedenen Bakterien im Verlauf der Laktation ab. Diese Abnahme unterliegt natürlich erheblichen Schwankungen. In den Milchproben von 3 Kühen wurden 6 Monate lang, mit kurzzeitigen Unterbrechungen, täglich Bangbakterien auf kulturellem Wege ermittelt. In der Trockenperiode Anreicherung der Bangbakterien im Euter.

Dauerausscheider zeigen in der Regel hohe Agglutinationswerte des Blut- und Milchserums (bei der Herstellung des Milchserums empfiehlt sich die Entfernung des Fettes durch Chloroform). Bei Gelegenheitsausscheidern können, selbst bei fehlender Agglutinationsfähigkeit des Milchserums, an vereinzelten Tagen Bangbakterien in der Milch nachgewiesen werden.

Die Bangbakterien können eine selbständige Infektion des Euters hervorrufen.

Zum Nachweis der Bangbakterien in Milch hat sich der Meerschweinchenversuch als zuverlässigstes Feststellungsverfahren erwiesen. Gemeinsame Käfighaltung der infizierten Tiere ist zu unterlassen, da Kontaktinfektionen vorkommen. Bei bangbakterienreichen Einzelmilchproben ist das Kulturverfahren (Gentianaviolett-Malachitgrünagarplatte) dem Tierversuch annähernd gleichwertig. Gelegentlich versagt der Tierversuch bei positivem Kulturbefund. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Fink, H. und Lechner, R., Herstellung von Futterhefe aus Sulfitablauge. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 775—777.)

Sulfitablaugen enthalten etwa 2—2,5% vergärbare Kohlenhydrate, die mit besonderen Hefen vergoren werden können. Die Alkoholausbeute beträgt 10 l je Kubikmeter Ablauge. Für die Erzeugung von Futterhefe stellt die Sulfitablauge wegen ihres hohen Gehaltes an hefefremden Ballaststoffen ein noch weniger ideales Ausgangsmaterial dar als der Holzzucker. Es gelang aber trotzdem auch in Sulfitablaugen die Futterhefenerzeugung in Dauerzüchtung ohne jeden Zusatz von organischem Stickstoff, lediglich mit Ammoniak als Stickstoffquelle. Verwendet wurde eine Sulfitablauge mit 2,56% vergärbarem und 3,9% reduzierendem Zucker. Der Gesamtstickstoffgehalt betrug 110 mg/l. Die Stellhefe war eine sorgfältig angepaßte Torulahefe, die schon etwa ½ Jahr in Holzzuckerlösung vorgezüchtet worden war.

Aus 1000 g vergärbarem Zucker wurden erhalten:

	Hefetrockensubstanz in g	Eiweißgehalt in %	Eiweißtrockensubstanz in g
1. Führung . . .	46,6	—	—
2. Führung . . .	45,5	51,9	23,6
3. Führung . . .	51,1	53,7	27,4
4. Führung . . .	55,2	53,5	29,6
5. Führung . . .	58,7	53,5	31,4
Mittelwert . . .	51,4	—	28,0

Die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz waren etwas höher als bei Versuchen mit Schöller-Zucker, der Eiweißgehalt der Hefe ist aber etwas niedriger als bei den Versuchen mit Holzzucker. Bemerkenswert ist die durch das Ansteigen der Ausbeute gekennzeichnete Anpassung der Hefe und ihre Reinheit. Es ist denkbar, daß die Alkoholerzeugung und die Futterhefegewinnung aus Sulfitablauge nebeneinander bestehen können, indem man die unverdünnte Kochlauge für erstere, die Waschwässer für letztere verwendet. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F. und Silbereisen, K., Über die Permeabilität der Hefezellmembran. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 281—284.)

Beim Aufbewahren einer mit Soda und Alkali gewaschenen Brauereihefe in destilliertem Wasser diffundieren schon in kurzer Zeit beträchtliche Mengen von Hefengummi aus den Zellen in die Außenflüssigkeit. Im Bier dagegen sind nur minimalste Mengen von Hefengummi zu finden, trotz der langen Lagerzeit findet also in diesem Milieu keine Diffusion statt. Diese Unterschiede müssen entweder in dem Unterschied der beiden Medien begründet sein oder aber sie sind auf den mechanischen Reinigungseffekt der Zelloberfläche zurückzuführen, welcher durch die Behandlung mit Alkalien erzielt wurde.

Experimentell wurde bewiesen, daß die Diffusion des Hefengummis in Leitungswasser gegenüber destilliertem Wasser, also im elektrolythaltigen Milieu, sehr stark gehemmt, unter Umständen sogar völlig unterbunden wird. Diese Gesetzmäßigkeit gilt jedoch nicht für sämtliche Inhaltsstoffe der Hefenzelle: im salzhaltigen Milieu ist die Stickstoffdiffusion im Gegenteil stärker als im destillierten Wasser. Der Einfluß der Wasserzusammensetzung auf die Permeabilität wird besonders deutlich, wenn man die Hefe erst in destilliertes Wasser und dann in Leitungswasser bringt oder umgekehrt. Durch Erhöhung der Temperatur, ebenso durch eine vorangegangene Sodawäsche wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht. Bei Bäckerhefe besteht in der Diffusion zwischen Leitungs- und destilliertem Wasser im Gegensatz zur Brauereihefe kaum ein Unterschied, jedoch ist der überhaupt diffundierbare Anteil an Hefengummi bei der Bäckerhefe erheblich geringer als bei der Brauereihefe.

Für wissenschaftliche Untersuchungen, bei denen die Hefe in irgendeiner Form der Einwirkung von Wasser ausgesetzt wird, ist also die Beschaffenheit des Wassers zu beachten, ebenso ist in der Praxis bei der Hefewäsche der Zusammensetzung des Wassers entsprechende Aufmerksamkeit zu schenken. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F. und Koch, R., Ausbeutebestimmungen bei hoch- und niedrigvergärenden untergärigen Bierhefen. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 325—330.)

In Brauereien, die hoch- und niedrigvergärende Heferassen nebeneinander im Gärkeller führen, kann man beobachten, daß die Hefenausbeute nach dem Schlauchen des Bottichs bei beiden Rassen deutlich voneinander verschieden ist. Niedrigvergärende Bruchhefen liefern gewöhnlich mehr Hefebodensatz als hochvergärende Staubhefen. Damit schien eine Möglichkeit gegeben, an Hand von Ausbeutebestimmungen hoch- und niedrigvergärende Rassen voneinander zu unterscheiden. Dazu war zu untersuchen, ob auch im laboratoriumsmäßigen Kleinversuch, der nach den bisherigen Erfahrungen sonst keine brauchbaren Unterscheidungsmerkmale für hohe und niedrige Vergärung liefert, hoch- und niedrigvergärende Heferassen ebensolche Unterschiede in der Erntemenge zeigen wie im Gärbottich.

Die Ermittlung der Hefeernten bei den durchgeführten Versuchen mit einer Reihe von Hefen geschah durch Zählung der Zellen in der Volumeneinheit, durch Bestimmung der Trockensubstanz und des Hefevolumens. Es zeigte sich, daß auch die extremsten hoch- und niedrigvergärenden Hefen durchschnittlich die gleichen Ausbeuten an Hefematerial liefern. Dies gilt in gleicher Weise für die Zellenzahl, das Hefevolumen und die Hefetrockensubstanz. Man konnte also bei den Laboratoriumsversuchen in bezug auf die Vermehrungsfähigkeit in Bierwürze zwischen hoch- und niedrigvergärenden Stämmen keine Unterschiede feststellen. Die Beobachtungen der Praxis sind nur so zu erklären, daß beide Arten von Hefen im Prinzip die gleiche Ernte an Zellsubstanz liefern. Die vergärenden Staubhefen bleiben länger im Bier schweben, von ihnen geht ein größerer Teil mit ins Lagerfaß. Die niedrigvergärenden Hefen sind häufig Bruchhefen, gehen früher zu Boden und liefern deshalb im Gärbottich einen größeren Bodensatz.

Heuß (Berlin).

Silbereisen, K., Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes und des Volumens von Hefezellen. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 340—343.)

Die bisherigen Angaben über das spezifische Gewicht von Hefe schwanken zwischen 1,0821 und 1,180; sie sind mit Methoden ermittelt worden, die keinen Anspruch auf Genauigkeit machen können. Zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes einzelliger Organismen sind bisher 3 verschiedene Prinzipien angewendet worden: 1. Bestimmung des spezifischen Gewichts einer Flüssigkeit, in welcher die Zellen gerade im Schwebezustand gehalten werden; 2. Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen und Errechnung des spezifischen Gewichts aus derselben nach dem Stockeschen Gesetz; 3. Pyknometrische Ermittlung des Gewichtes und Volumens der Zellaufschwemmung und Errechnung des spezifischen Gewichts aus dem Quotienten beider Werte. Verf. hat in Anlehnung an Arbeiten von Ruffilli über die Bestimmung des spezifischen Gewichts von Bakterien derartige Bestimmungen auf dem dritten Weg versucht. Als geeignete Suspensionsflüssigkeiten wurden Dextrin, Pepton, vor allem aber Hämoglobin erkannt. Man fand damit in der gleichen Reihenfolge als mittleres spezifisches Gewicht der Hefezelle 1,12143, 1,11804 und 1,12179, woraus sich ein Durchschnitt von 1,12042 errechnete. Heuß (Berlin).

Virtanen, A. J, Zur Mikrobiologie der Aufbewahrung von Grünfutter. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 785.)

Bei der Aufbewahrung von Futtermitteln nach dem AJV-Verfahren wird das Frischfutter mit starken Mineralsäuren auf ein p_H von 4—3 gebracht, wodurch schädliche Kleinlebewesen zerstört und die Bildung von Ammoniak und die Atmung der Pflanzenzellen verhindert werden. Die Mineralsäure verschwindet rasch durch Verbindung mit den vorhandenen Kationen. Dabei werden organische Verbindungen freigesetzt, deren saurer Charakter für die

Reaktion der Silomasse verantwortlich ist. Die Tätigkeit der Milchsäurebakterien wird nicht völlig unterbunden. Entstehende Essigsäure rührt wahrscheinlich aus der Vergärung von Pentosen durch Lactobacillus pentoaceticus her, wobei Milch- und Essigsäure im Verhältnis 6 : 4 gebildet werden. Das wichtigste Kleinlebewesen der AJV-Silage ist Lactobacillus. Andere Pentosen vergärende Bakterien kommen aus der Gruppe des Betacoccus, außerdem sind Sporen von B. subtilis, B. mesentericus und B. amylobacter neben Hefen vorhanden.

Heuß (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Cholodny, N. G., Bodenstaubkulturen und die Mikroflora des Bodens. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 286—296.)

Als Bodenstaubkulturen bezeichnet Verf. Deckglaskulturen mit fein gesiebtem Bodenstaub. Obwohl jeder Nährboden benutzt werden kann, zog Verf. vor, lediglich in dest. Wasser zu kultivieren, um die primäre Mikroflora des Bodens zu erfassen. Bald zeigt sich ein Auskeimen; es sind Bakterien, Aktinomyceten, Pilze und einige Protozoen festzustellen; die Anhäufungen der Bakterien finden sich vorwiegend unmittelbar neben den Bodenpartikelchen, aber auch auf der reinen Glasoberfläche. An den die Bodenpartikelchen umgebenden Wassermenisken bilden sie manchmal radial strukturierte Kolonien. Schleim- und Kapselbildung ist bei den Bakterien auffallend. Die Methode eignet sich insbesondere für Bakterien und Aktinomyceten, während Pilze besser mit Hilfe der Methode der Bodenkammer zu untersuchen sind.

Wurden die Präparate mit festem Paraffin verkittet, so fand eine üppige Entwicklung von Korynebakterien statt, die sich von Spuren des Paraffins oder sonstigen flüchtigen organischen Stoffen daraus ernähren. Wurde das Deckglas durch reines Wasser angekittet, so unterblieb ihre Entwicklung.

Rippel (Göttingen).

Cyplenkin, E. I. und Schilin, D. G., Über die Nitrifikation in Tundraböden. (Die Chemisation d. soz. Landw. Bd. 5. 1936. S. 59—63.) [Russisch.]

Der mit H gesättigte Boden erwies sich als völlig gehaltslos an Nitraten, der mit Ca gesättigte enthielt 69,3—71,2 mg NO_3. Die Untersuchung der Mikroflora in den beiden Böden zeigte, daß in dem mit H gesättigten Böden (bei $p_H = 4$ und 6) keine Bakterien und sehr zahlreiche Pilze (4,0—7,5 Millionen je 1 g Boden) vorhanden waren. Die Untersuchung der an verschiedenen Stellen genommenen Bodenproben zeigte, daß die größte Nitratmenge auf den erhöhten und besser erwärmten Stellen, die geringste auf den tiefer liegenden vorhanden war.

M. Gordienko (Berlin).

Waksman, S. A., and Carey, C. L., Decomposition of Organic Matter in Sea Water by Bacteria. I. Bacterial Multiplication in Stored Sea Water. (Journ. Bact. Vol. 29. Nr. 5. 1935. p. 531—543.)

Mit Bezug auf den Gehalt des Wassers an verwertbarer organischer Substanz wird die Keimzahlerhöhung und Sauerstoffzehrung während der Lagerung in Wasserproben verschiedenen Ursprungs untersucht. Beiden parallel geht eine Abspaltung verwertbarer Stickstoffverbindungen. Die

Bakterienvermehrung ist in den ersten 2—3 Tagen am stärksten und abhängig von Temperatur und Sauerstoffspannung. Sie geht vor sich auf Kosten der gelösten und suspendierten organischen Stoffe, welche bei geringer Sauerstoffspannung bedeutend schwerer angegriffen werden.

C. R. Baier (Kiel).

Waksman, S. A., and Carey, C. L., Decomposition of Organic Matter in Sea Water by Bacteria. II. Influence of Addition of Organic Substances upon Bacterial Activities. (Journ. Bact. Vol. 29. Nr. 5. 1935. p. 545—561.)

Die Vermehrung der Bakterien in Seewasserproben wird bestimmt durch die Menge und Art der zugesetzten organischen Stoffe. Der Abbau stickstofffreier organischer Stoffe ist von der Menge des verwertbaren Stickstoffs abhängig. Die Menge des letzteren kann daher direkt an dem Ausmaß des Glukoseabbaues erkannt werden. Ein Rest Glukose bleibt auch bei genügender Stickstoffnahrung unzersetzt. Es wird versucht, die Stabilität und Gleichförmigkeit der organischen Substanz des Seewassers als Ausdruck eines dynamischen Gleichgewichtes von Neubildung und bakteriellem Abbau zu erklären, wobei letzterer durch hemmende Faktoren reguliert wird.

C. R. Baier (Kiel).

Baier, C. R., Wesen und Bedeutung hydrobakteriologischer Forschung. (Der Biologe. 4. Jahrg. H. 3. 1935. S. 73—75.)

Es wird auf die wissenschaftliche Bedeutung und den praktischen Wert der hydrobakteriologischen Forschung hingewiesen. Eine allgemeine Förderung hydrobakteriologischer Studien mit einer von der medizinisch-bakteriologischen verschiedenen, eigenen Methodik, die den speziellen Verhältnissen des Milieus angepaßt ist, wird angeregt. Hierzu muß den Biologen (Hydrobiologen) Gelegenheit zu allgemein-bakteriologischem Studium gegeben werden. Zu dem Toblerschen Plan der Diplombiologen-Prüfung wird Stellung genommen. Autorreferat.

Ginsburg-Karagitschewa, T. und Rodinowa, K., Beitrag zur Kenntnis der im Tiefseeschlamm stattfindenden biochemischen Prozesse. (Biochem. Ztschr. Bd. 275. H. 5/6. 1934. S. 396—404.)

Im Tiefseeschlamm des Schwarzen Meeres wurde das Vorhandensein bituminöser, kohlenwasserstoffartiger Stoffe festgestellt. Das Vorkommen sulfatreduzierender, fett-, eiweiß- und zellulosespaltender Bakterien wurde nachgewiesen. Fettspaltende Bakterien wurden isoliert und untersucht. Sie verändern Fette und Fettsäuren weitgehend, wobei besonders die Verkleinerung der Jodzahl und die Erhöhung des Gehaltes an Unverseifbarem charakteristisch ist. Die Bakterien des Schwarzmeer-Tiefseeschlammes erinnern in ihrem biochemischen Verhalten an die aus Erdölvorkommen der USSR isolierten Bakterien. C. R. Baier (Kiel).

Kusnetzow, S. I., and Kusnetzowa, Z. I., Bacteriological and Chemical Investigations on Lake Muds in Connection with a Bottom Emission of Gases. (Arb. Limnolog. Stat. Kossino. Bd. 19. 1935. S. 127—144.) [Russisch, engl. Zusfassg.]

—, Microbiological researches in the study of the

oxygenous regime of lakes. (Verhandl. d. Int. Ver. f. theor. u. angew. Limnologie. Bd. 7. 1935. S. 562—582.)

Ausgehend von der Annahme, daß die Bakterienflora von wesentlicher Bedeutung für den Stoffhaushalt der Gewässer ist, untersuchen Verff. den Anteil des bakteriellen Stoffwechsels am Sauerstoff-Umsatz russischer Seen. Durch Vergleich der Untersuchungsergebnisse anderer Autoren über die Atmungsgröße gewisser Zooplankter und Bakterien mit eigenen früheren und neuen Bestimmungen der Bakterienzahlen und des Sauerstoffgehaltes des Wassers und durch einfache, aber überzeugende Versuche über die bakterielle Oxydation von Methan und Wasserstoff in Wasserproben ergeben sich folgende bemerkenswerte Schlüsse.

Der in manchen Gewässern Fischsterben verursachende Sauerstoffschwund kann im Gegensatz zu der Auffassung Alsterbergs nicht von der Absorption des Sauerstoffs durch den Schlamm herrühren. Die Atmung des Zoo- und Phytoplanktons hat ebenfalls nur geringe Bedeutung. Der wesentliche Sauerstoffzehrung verursachende Faktor ist in den Gewässern, aus deren Schlamm Methan-Wasserstoffblasen aufsteigen, die bakterielle Oxydation dieser Gase. Hierzu befähigte Bakterien wurden in allen untersuchten Gewässern nachgewiesen. In Wasserbecken ohne Schlammgasbildung ist die bakterielle Atmung hauptsächlich für die in diesem Falle viel geringere Sauerstoffzehrung verantwortlich. Bakterien, die Zellulose und Fettsäuren unter Gasbildung zersetzen, wurden im Schlamme der Seen Trostenkoje, Beloje und Glubokoje gefunden, obgleich in letzterem keine Schlammgasblasen gebildet werden. Hier müssen also die Milieubedingungen ungünstig für die Gasbildung sein. Der Vergleich der tolerierten und optimalen Oxydations-Reduktionspotentiale, bei denen Ameisensäure in Anreicherungs- und Reinkulturen unter Gasbildung zersetzt wird, mit dem in verschiedenen Schlammproben gemessenen r_H ergab, daß dieses nicht der die Gasbildung hemmende Faktor sein kann. Detaillierte Schlammanalysen ergaben, daß der Schlamm des Glubokoje bedeutend ärmer an organischen Substanzen ist als der der Beloje. Dieser Schlamm zeigte im Gegensatz zu dem des Beloje in vitro Gasbildung erst nach Peptonzusatz. Mangel an organischen Stoffen ist als offensichtlich der im Glubokoje die Schlammgasbildung hemmende Faktor. C. R. Baier (Kiel).

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz im allgemeinen.

Mader, E. O., and Blodgett, F. M., Effects of modifications of the potato spray program. (Corn. Un. Exp. Stat. Bull. 621. 1935. 34 p.)

Bei ihren Versuchen in den Jahren 1929—1933 mit der Kartoffelsorte Rural stellten Verff. fest, daß eine Erhöhung des Ertrages auch dann eintrat, wenn die Phytophthora sich nicht zeigte. Das günstigste Ergebnis wurde erhalten, wenn etwa 1300 l Spritzflüssigkeit auf 1 ha bei einem Druck von 28 Atm. verspritzt wurden. Die Anwendung eines höheren Druckes verbesserte das Ergebnis nicht. Bei Verwendung von 80 kg Kupfersulfat auf 1 ha wurden die höchsten Erträge erzielt. Hinsichtlich der Erträge wirkte sich eine frühe Anwendung des Kupfers am günstigsten aus. Versuche mit verschiedenen Kalkherkünften ergaben keine Unterschiede. Nur die Verwendung von Kalk mit hohem Magnesiumgehalt hatte geringe Mehrerträge zur Folge. Geringer Kalkzusatz war besser als hoher. Verff. empfehlen Kupferkalkbrühe 5 : 2½ : 50. Mit Stäubemitteln konnten dieselben Erträge wie mit Kupferkalkbrühe erzielt werden, doch war die erforderliche Kupfermenge größer als bei Kupferkalkbrühe.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Crosby, C. R., Mills, W. D., and Blauvelt, W. E., Protecting orchard crops from diseases and insects in Western New York. (Corn. Extension Bull. Vol. 313. 1935. 92 p., 18 figs.)

—, **and Mills, W. D.,** Protecting orchard crops from

diseases and insects in the Hudson Valley. (Corn. Extension Bull. Vol. 314. 1935. 89 p., 16 figs.)

In beiden Bulletins werden die Erreger von Krankheiten und Schädlinge von Äpfeln, Birnen, Kirschen, Pfirsich und Pflaumen, in Bulletin 313 auch die von der Quitte, besprochen und die Maßnahmen zu ihrer Bekämpfung angegeben. In einem weiteren Kapitel werden dann noch die für die Bekämpfung empfohlenen Mittel eingehender behandelt.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Young, H. C. und Beckenbach, J. R., Spreader materials for insoluble copper sprays. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 450—455, 2 figs.)

Verff. stellten Versuche mit Bentonit als Haftmittel für Kupfermittel an. Es wurden 3 verschiedene Arten von Bentonit für die Versuche verwendet. Ein Präparat verhielt sich ähnlich wie Kaolin oder Talkum. Die Haftfähigkeit war nicht gut. Mit Wyoming Bentonit (Handelsbezeichnung Wyobond) wurden gute Erfolge erzielt. Ein patentiertes Präparat Wyojel enthielt einen geringen Prozentsatz Magnesiumoxyd.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Flor, H. H., Flax seed-treatment tests. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 429—438.)

Verf. führte Beizversuche an Leinsamen mit Formaldehyd im Benetzungsverfahren und mit Ceresan und Kupferkarbonat im Trockenbeizverfahren durch. Die Versuche wurden an 11 Stationen in Minnesota, Nord- und Süddakota sowie in Montana vorgenommen. Krankheiten, die erfahrungsgemäß durch Saatgutbehandlung bekämpft werden können, traten in den 4 Versuchsjahren nicht auf. Keine der Behandlungen hatte nennenswerten Einfluß auf das Auftreten der Flachswelke. In einigen Fällen wurde durch die Beizung mit Ceresan oder Kupferkarbonat in den feuchten Gebieten von Südost-Minnesota ein besserer Bestand erzielt. Die Behandlung mit Formaldehyd hatte vielfach einen schlechteren Auflauf als bei „Unbehandelt" zur Folge. Verf. äußert die Ansicht, daß z. Zt. die Beizung des Leinsamens in Nord- und Süddakota, in Montana und dem westlichen Teil von Minnesota nicht gerechtfertigt erscheint. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Hartzell, A., and Wilcoxon, Chemical and toxicological studies on organic thiocyanates. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. 1935. p. 497—502.)

Im Anschluß an frühere Arbeiten über die insektizide Wirkung organischer Verbindungen mit SCN haben Verff. diesmal Trimethylen- und Laurylthiozyanat miteinander verglichen. Die mit Penetrol versetzten Lösungen wurden an Aphis rumicis ausprobiert. Bezogen auf gleichen SCN-Gehalt wirkte die Laurylverbindung giftiger. Thiazolderivate waren unwirksam, Rotenon dagegen übertraf alle angewandten Stoffe. Als Magengifte kommen die Thiozyanate nicht in Frage, wie Fütterungsversuche an Raupen bzw. Larven von Bombyx mori, Alsophila pometaria, Epitrix cucumeris und Macrodactylis subspinosus darlegten, auch nicht Verbindungen vom Typ des γ-Thiozyanopropylphenyläthers. Skallau (Berlin).

Wilcoxon, Fr., and McGallan, S. E. A., Fungicidal action of organic thiocyanates, resorcinol derivates, and

other organic compounds. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. 1935. p. 333—340.)

Als Versuchsobjekte dienten Sclerotinia fructicola, Botrytis paeoniae, Pestalotia stellata, daneben in einzelnen Fällen Cladosporium fulvum. 32 verschiedene Präparate wurden in Lösung ausprobiert, ob sie die Keimung der Konidiosporen verhindern konnten. Die Wirkung war je nach Verbindungstyp ungleichmäßig: die organischen Thiozyanate wiesen eine hohe Giftigkeit auf, die in einigen Fällen denen des $CuSO_4$ nicht nachstand. Dahin gehören Trimethylenthiozyanat, Lauryl- und Phenylisothiozyanat u. a. Die chemisch verwandten Thiazole wie 2-Oxy-4-phenylthiazol, 4-Oxythiazolon fielen dagegen stark ab. Andererseits wirkten Alkyl- und Acylderivate des Resorzins hochgradig fungizid, Catechol und Protocatechusäure nur schwach, so daß ihre Anwendung in der Praxis unwirtschaftlich ist, ebenso wie die der Thiazole. Formalin wirkt auch nicht so stark, wie man vermuten sollte. Gänzlich unwirksam ist KSCN. Skallau (Berlin).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Bergman, H. F., and Wilcox, M. S., The distribution, cause and relative importance of cranberry fruit rots in Massachusetts in 1932 and 1933, and their control by spraying. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 656—664.)

Glomerella, Sporonema und Diaporthe verursachten starke Verluste bei Preißelbeeren in den Jahren 1932 und 1933. Diaporthe brachte 1933 Ausfälle von 18—35%. Eine einmalige Anwendung von Kupferkalkbrühe, der als Haftmittel Kalifischölseife zugesetzt war, genügte für die Bekämpfung nicht. In den meisten Fällen wurde aber durch zwei Spritzungen dasselbe wie durch drei Spritzungen erreicht. Zwei Spritzungen mit Phenylquecksilberacetat oder Äthylquecksilberarsenat wirkten ebensogut wie Spritzungen mit Kupferkalkbrühe. Im übrigen zeigte sich, daß Glomerella und Diaporthe schwieriger als Sporonema zu bekämpfen sind.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Tropowa, A. T., Pilzkrankheiten neuer technischer Kulturen und die Prüfungsergebnisse einiger Bekämpfungsmittel dieser. (Arb. d. Versuchsstat. Rostowo-Nachičewanskaja a. Don. Bulletin Nr. 247. 14 S.) [Russisch.]

Die Versuchsstation Rostowo-Nachičewanskaja machte einige Beobachtungen über verschiedene Pilzerkrankungen bei neu in Kultur genommenen Pflanzen, wie Gossypium hirsutum L., Hibiscus cannabinus L., Ricinus communis L. u. a. Es wurde festgestellt, daß Botrytis cinerea Pers., sodann Macrosporium cavara Paris. und Macrosporium compactum Cooke durch die Bespritzung mit Kalifornischer Brühe gut bekämpft werden können; gegen die Verbreitung von Bact. solanacearum E. F. S. bei Ricinus communis L. hat sich Samenbeizen mit Formalinlösung (1 : 200) sehr gut bewährt, dagegen blieb aber die Bespritzung mit Kalifornischer bzw. mit Bordeaux-Brühe erfolglos (auch gegen Puccinia carthami Corda auf Carthamus tinctorius L.). Die Beizung mit Formalinlösung erhöhter Konzentration (0,2) hat keine ungünstige Wirkung auf die Keimfähigkeit der Samen ausgeübt. M. Gordienko (Berlin).

Wolf, F. A., McLean, R. A., and Dixon, L. F., Further studies on downy mildew of tobacco. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 760—777, 8 figs.)

Die Primärausbrüche von Mehltau an Tabak zeigen sich besonders dort, wo Saatbeete an Stellen angelegt wurden, an denen sich diese auch im Vorjahre befanden. Von den drei Erregern, die den Mehltau hervorrufen können: Peronospora hyoscyami, P. nicotianae und P. tabacina, kommt im Südosten der Vereinigten Staaten der letztere in Frage. Für die Eindämmung der Krankheit ist es wesentlich, daß die Saatbeete nicht an denselben Stellen wieder angelegt und daß die Sämlinge in stärkerem Maße der direkten Sonnenbestrahlung ausgesetzt werden. Auch einige Gaben von Natriumnitrat haben sich als günstig erwiesen.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Pichler, F., Über die Verwendbarkeit von Wasserstoffsuperoxyd als Saatgutbeizmittel. (Phytopath. Ztschr. Bd. 8. 1935. S. 245—251.)

Nach einer ablehnenden Kritik der Versuche von Kisser und Portheim über die Verwendbarkeit von Wasserstoffsuperoxyd als Saatgutbeizmittel berichtet Verf. über eigene Untersuchungen, die teilweise im Laboratorium, teilweise im Freiland durchgeführt worden sind. Im ersten Fall wurde die Keimung von Steinbrandsporen durch 10 und 15 proz. Wasserstoffsuperoxydlösung überhaupt nicht beeinflußt, während bei 30% nur einzelne keimten, die aber immer noch auf nennenswerten Befall schließen ließen. Die Freilandversuche bestätigten das Ergebnis der Laboratoriumsversuche. Selbst mit 30% Wasserstoffsuperoxyd konnte keine befriedigende Wirkung gegen Weizensteinbrand, Haferflugbrand und Gerstenhartbrand erzielt werden. Dagegen konnte in Übereinstimmung mit Kisser und Portheim keine Keimschädigung festgestellt werden. Nur bei Weizen war solche bei der Höchstkonzentration von 30% in starkem Maße zu bemerken.

Braun (Berlin-Dahlem).

Lund, Aage, Note on some Sumatran Fungi. (Bot. Tidsskr. Bd. 43. 1935. S. 305—310.)

Es werden folgende Pilze beschrieben: 1. Aldona stella nigra. Höhnel hat diesen Pilz, der auf Blättern von Pterocarpus indicus parasitiert, schon 1918 in seinem Werke „Über die Hysteriazeen" geschildert, wo er ihn zu den Phazidiazeen stellt. 2. Pestalozzia Arengae n. sp. auf Blättern von Arenga saccharifera vorkommend, über den Verf. in der Literatur keine Angaben finden konnte. 3. Eine nicht näher bezeichnete Pestalozzia-Art, ebenfalls erstmalig, auf einer nicht bestimmten Pithecolobium-Art. 4. Cerebella anthisteriae Petch, der besonders in den Fruchtknoten der Blütenstände von Themeda gigantea (Anthistiria gig.) auftritt, dessen systematische Stellung jedoch noch umstritten ist.

Skallau (Berlin).

Schnellhardt, O. F., and Heald, F. D., Pathogenicity tests with Botrytis spp. when inoculated in apples. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 786—794, 3 figs.)

Die Graufäule der Äpfel bei der Lagerung verursacht in Washington besonders große Ausfälle, wenn während der Ernte viel Regen fällt. Die Graufäule breitet sich bei der Kaltlagerung schneller aus als die Blaufäule.

Mit 19 Isolationen von Botrytis-Spezies meist vom cinerea-Typ wurden Infektionen an Äpfeln vorgenommen. Nur die Botrytis-Spezies vom cinerea-Typ erwiesen sich als Parasiten. Der Pilz schien stärker pathogen zu sein, wenn er unmittelbar von den Isolationen übertragen wurde, als wenn das Infektionsmaterial von einer künstlichen Kultur genommen wurde. Pflanzen mit Graufäule in der Nähe von Obstgärten und Lagerhäusern sind möglicherweise Infektionsquellen für das Obst bei der Lagerung.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Imai, S., On the causal fungus of the Typhula-blight of gramineous plants. (Jap. J. Bot. Vol. 8. 1936. p. 5—18.)

In Japan hat Sei-Un Miyanaga schon 1788 die Typhulafäule der Gramineen entdeckt. Da über die taxonomische Stellung dieses Schadpilzes immer noch Unklarheiten bestehen, hat Verf. die Entwicklung von T. untersucht. Er verglich dabei den in seiner Heimat vorkommenden Krankheitserreger mit einem unter der Bezeichnung Typhula graminum Karst. laufenden Exemplar aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holland) hinsichtlich Charakter und Habitus. Beide waren identisch. Die vom Verf. gefundenen Sklerotien ähneln sehr Sclerotium fulvum Fries, aber nicht Scl. rhizodes Auersw., wie vielfach in der Literatur angegeben. Zur Fruchtbildung sind Temperaturen von 4—10° C, Licht und Feuchtigkeit erforderlich. Abgesehen von der Sklerotienbildung, die Typhula elegantula abgeht, ist der japanische Schädling T. eleg. ähnlich, nicht jedoch mit ihm identisch, wie Verf. 1929 annahm. In der Ausbildung der Fruchtformen weicht der japanische Pilz gänzlich von dem in der Literatur unter Typhula graminum Karst. beschriebenen Pilz ab, so daß Verf. den schon 1929 gemachten Vorschlag (auch jap. Phytopathologenkongreß 1933) wiederholt, den behandelten Pilz Typhula Itoana Imai zu nennen. Als Vulgärbezeichnung schlägt er „Typhula-blight" vor, obwohl das Krankheitsbild, hervorgerufen durch Fusarium, Pythium usw. demjenigen der Typhulafäule ähnelt. Skallau (Berlin).

Krupko, St., O plywkach u Phytophthora nicotianae Breda de Haan. [Sur les zoospores de Phytophthora nicotianae.] (Acta Soc. Bot. Pol. Vol. 11. Suppl. p. 385—400. 1934.)

Die Zoosporen dieses Schadpilzes sind linsenförmig, zuweilen birnförmig, im Ruhestadium nierenförmig. Meist sind die beiden Geißeln seitlich inseriert, selten polar. Verf. beobachtete auch Sporen mit 4 Zilien (unterbliebene Teilung im Zoosporangium?). Von Phyt. erythroseptica unterscheidet sich dieser Pilz durch das Fehlen eines dünnen Kanals bei der Keimung des Sporangiums, die Sporen entweichen direkt durch die Mündung. In der Bewegung sieht man im Innern der Zoospore eine große Vakuole, die sich beim Übergang in die Ruhe in mehrere kleinere unterteilt. Solche ruhenden Zellen entlassen oft ein zweites Mal Zoosporen, die den erstgeschlüpften — aus dem Zoosporangium — ähnlich sind. Verf. schlägt für diese Erscheinung den Begriff „zufälliger Diplanetismus" vor, er soll durch vorhergehende Austrocknung und nachfolgende Wiederbefeuchtung hervorgerufen werden. (Diplanetismus ist bei den Saprolegniaceen schon lange bekannt. Anm. d. Ref.) Der „indirekte Diplanetismus" Drechslers ist nach Ansicht Verf.s gar keiner. Die Kerne der ruhenden Sporen gleichen denen der Sporen im Zoosporangium, die einkernig, selten zweikernig sind.

Skallau (Berlin).

Kochman, J., Przyczynek do znajomosci flory glowni polskich. [Contribution to the knowledge of the Polish Ustilaginales.] (Acta Soc. Bot. Pol. Vol. 11. Suppl. p. 285—304. 1934.)

Vorliegende Arbeit stellt den Auftakt zu einer größeren Studie über die polnischen Ustilaginales dar. Verf. beschreibt Ustilago persicariae auf Polygonum persicaria, Ustilago aculeata auf Triticum repens, Ustilago Rabenhorstiana auf Panicum lineare. Neu aufgestellt wird die Art Entyloma Wrolewskii n. sp. auf Ranunculus polyanthemos. Zum Schluß wird die Kollektivform Cintractia caricis in 6 Rassen zerlegt, je nachdem, welche Sauergräser von ihr befallen werden. Skallau (Berlin).

Radulescu, E., Untersuchungen über die physiologische Spezialisierung bei Flugbrand des Weizens Ustilago tritici (Pers.) Jens. (Phytopath. Ztschr. Bd. 8. 1935. S. 253—258.)

Verf. hat 7 Flugbrandherkünfte von Winter- und 8 von Sommerweizensorten in verschiedenen Teilen Rumäniens isoliert. Außerdem wurden noch je eine von Sommerweizensorten aus Halle und der Tschechoslowakei isoliert. Als Testsortiment wurden benutzt für die Winterweizenherkünfte Kraffts Dickkopf, Vilmorin 27, Blaues Kolben, Alpha Stepka, Turkey, für die Sommerweizensorten Stephany 71, Rimpaus roter Schlanstedter, Saumur de Mars, Peragis, Hohenheimer 25 f, Vensy, Blue Ribbon. Bei den Winterweizenherkünften konnten keine biologischen Rassen, bei den Sommerweizenherkünften dagegen 4 nachgewiesen werden. Dies Ergebnis wird darauf zurückgeführt, daß die Flugbrandherkünfte nicht an eine geographische Lage gebunden sind, sondern daß sie von der Wirtssorte abhängig sind. Die für die Isolierung benutzten Winterweizensorten sind genotypisch wenig verschieden, die Sommerweizensorten sind ganz verschiedener Abstammung. Drei von den isolierten Rassen entsprechen den von Grevel bereits gefundenen. Braun (Berlin-Dahlem).

Leukel, R. W., Factors influencing infection of barley by loose smut. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 630—642.)

Verf. untersuchte den Einfluß von Temperatur und Bodenfeuchtigkeit auf den von Tapke beschriebenen Erreger Ustilago nigra des durch chemische Mittel bekämpfbaren Gerstenflugbrandes. Hohe Bodenfeuchtigkeit war für die Infektion bei 5° und 30° C ungünstig, während trockner Boden die Infektion bei 5° C begünstigte. Bei anderen Temperaturen waren Unterschiede von 30—55% in der Sättigung des Bodens ohne Einfluß auf das Auftreten. Die minimale Temperatur liegt unter 5°, die optimale bei 15—20° und die maximale über 30° C. Pflanzen, die bis zum Auflauf bei 30° gehalten und in Boden von 13° C gebracht wurden, zeigten weniger Befall als solche, die länger in Boden von 30° C waren. Bei Pflanzen, die von Boden von 13° C in solchen von 3° oder 5° kamen, war eine Verringerung des Befalls gegenüber solchen, die dauernd bei 13° C gehalten wurden, festzustellen, während der Befall zunahm, wenn Pflanzen von 5 in 13 und 30° C überführt wurden. Durch Bestäuben der Körner mit Sporen wurde ein höherer Befall erzielt als mit der Infektionsmethode im Vacuum von Haaring. Es konnte festgestellt werden, daß eine Infektion nach der Bildung des ersten Blattes nicht mehr eintritt. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Ronsdorf, L., Weitere Untersuchungen über den Nachweis biologischer Rassen des Gerstenzwergrostes, Puccinia simplex Erikss. et Henn. (Phytopath. Ztschr. Bd. 8. 1935. S. 237—243.)

Verf.n ist der Frage nachgegangen, ob in Amerika und Europa die gleichen Rassen von Puccinia simplex vorkommen. Sie hat die deutschen Rassen II, III, IV, V und IX sowie drei amerikanische Einsporlinien auf dem 10 Sorten umfassenden Sortiment von Hey und auf dem 17 Sorten umfassenden Sortiment von Maines, von dem allerdings drei Sorten nicht zu beschaffen waren, geprüft. Es stellte sich heraus, daß die amerikanischen Rassen mit keiner der deutschen übereinstimmten und daß die deutschen auf dem amerikanischen Sortiment sich überhaupt nicht unterscheiden ließen, so daß das deutsche Sortiment dem amerikanischen überlegen ist. Außerdem konnte bestätigt werden, daß niedrige Temperaturen den Befallstyp meist erhöhen, selten erniedrigen.

Braun (Berlin-Dahlem).

Ullstrup, A. J., The occurrence of Gibberella fujikuroi var. subglutinans in the United States. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 685—693, 2 figs.)

Auf alten Maisstengeln wurden in New Jersey und Ohio Perithezien gefunden, die denen von Gibberella Saubinetii (Mont) Sacc. ähnlich waren. Bei genauerer Untersuchung ergab sich jedoch, daß es sich um solche von Gibberella fujikuroi (Saw) Wr. var. subglutinans handelte. Die Morphologie und das Verhalten in Kultur werden eingehend beschrieben. Das Konidienstadium konnte von dem von Fusarium moniliforme unterschieden werden, weil es schneller wächst und auf verschiedenen Nährböden, besonders auf gedämpftem Reis, stärkere Färbung zeigt. Die minimale und optimale Temperatur liegen etwas niedriger als bei F. moniliforme. Kulturen von einzelnen Askosporen bildeten reife Perithezien. Es ist deshalb anzunehmen, daß der Pilz homothallisch ist.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Oort, A. J. P., De Oogvlekkenziekte van de Granen, veroorzaakt door Cercosporella herpotrichoides Fron. [Die Fußkrankheit des Getreides, verursacht durch C. herpotrichoides Fron.] (Tijdschr. o. Pl. Heft 7 u. 8. 1936. S. 180—224, 10 Abb.)

In dieser ausführlichen Arbeit über die Fußkrankheit des Getreides behandelt Verf. zuerst die Literatur, wobei sich herausstellt, daß ursprünglich zwei Krankheiten miteinander verwechselt worden sind, nämlich diejenige, verursacht durch C. herpotrichoides, in Holland „Oogvlekkenziekte“, in Deutschland „Lagerfußkrankheit, Halmbrecher oder Halmbruchkrankheit“, in den Vereinigten Staaten „Columbia Basin Footrot“, in Frankreich endlich „Piétin verse“ genannt, und diejenige verusacht durch Ophiobolus graminis Sacc., in Holland „Tarwehalmdooder“, in Deutschland „Weizenhalmtöter“, in den Vereinigten Staaten „Take all“ und in Frankreich „Piétin échaudage“ genannt. Diese Krankheiten dürfen nicht miteinander verwechselt werden. Im Gegensatz zur Fußkrankheit welche nur in einigen kleinen Gebieten in Europa und den Vereinigten Staaten vorkommt, ist die zweitgenannte Krankheit über die ganze Welt verbreitet. Das Studium nach der Verbreitung der Fußkrankheiten wurde sehr ge-

fördert durch eine von Sprague (1931) mitgeteilte Methode, den bis dahin fast immer als steriles Myzel isolierten Pilz zur Fruktifizierung zu bringen.

Die Symptome der Krankheit, welche vorzüglich Weizen befällt, bestehen darin, daß im Herbst braune Verfärbungen auf Erdbodenhöhe an den Stengeln auftreten in Gestalt ovaler Flecken mit braunem Rande, welche sich alsbald auf andere Teile der Pflanzen ausbreiten. Typisch für die Krankheit sind kleine schwarze Myzelknäuel im Zentrum der Flecken. Im nächsten Jahre im Sommer fallen die Stengel um, einige sterben ab und werden weiß, die meisten aber bleiben am Leben und bilden graue Ähren.

Verf. bespricht dann ausführlich die Isolierung und Reinzüchtung des Pilzes, das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen, Sporenbildung usw. Versuche ergaben, daß der Pilz nicht nur Getreide, sondern auch eine ganze Anzahl Grassorten befallen kann. Von den Getreidearten werden Weizen und zwar fast sämtliche Sorten, und Gerste am leichtesten befallen, dagegen Roggen und Hafer sehr viel weniger. Bei der Isolierung verschiedener Stämme desselben Pilzes stellte der Verf. eine ziemlich stark variierende Virulenz fest. Die optimale Temperatur für C. herpotrichoides ist 5—9° C; für Ophiobolus ist dieselbe höher. Das Auftreten der Krankheit wird gefördert sowohl durch Phosphor- wie durch Stickstoffmangel.

Die Bekämpfung der Krankheit geschieht durch Sprühen mit Schwefelsäure, nicht wie üblich von oben sondern von der Seite. Die Behandlung soll zwischen 15. April und 15. Mai stattfinden mit einer 5—20 proz. Lösung (Schwefelsäure 55° B) für Sommerweizen und mit einer 20—30 proz. Lösung für Winterweizen (Carré). Nach Fron wirkt eine Bestäubung mit Ortho-oxy-chinolinsulfat sehr günstig.

Erwähnt wird schließlich noch die Resistenz verschiedener Rassen, der Einfluß der Zeit der Bestellung, Fruchtwechsel, Reihenabstand usw.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Bussy, Ivonne J. le Cosquino de, De Bacterienziekte van de Boon Phaseolus vulgaris L., veroorzaakt door Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola Burk. [Die Bakterienkrankheit der Bohne Phaseolus vulgaris L., verursacht durch Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola Burk.] Dissertation. Amsterdam (Verlag J. H. de Bussy) 1936. 84 S., 5 Taf.

Eine in den letzten Jahren verheerende Krankheit in Bohnenfeldern in der Provinz Nord-Holland ist die sog. Fettfleckenkrankheit, verursacht durch Pseudomonas medicaginis f. sp. phaseolicola Burk. Diese Krankheit, von Burkholder 1924 zuerst in Nord-Amerika festgestellt und von ihm „Halo-blight" genannt, ist auch unter dem Namen „Stippelstreep" den holländischen Züchtern wohl bekannt, wobei man jedoch ein Virus als Ursache vermutete. Verf.n wies nach, daß sowohl „Stippelstreep" wie „Halo-blight" durch das obengenannte Bakterium verursacht wird. Von den untersuchten Bohnenvarietäten erwiesen sich zwei in hohem Grade anfällig, nämlich „Gele Citroen" und „Verbeterde Vroege Veensche". Das Krankheitsbild wird folgendermaßen beschrieben: Im Monat Juli sieht man, daß die befallenen Pflanzen stark zurückgeblieben sind. Die oft gekräuselten Blätter zeigen gelbgrüne Flecken, die Nerven an der Rückseite sind braun und die Blattstiele und Stengel zeigen der Länge nach braune Streifen, welche einen verfrühten Blattfall bewirken. Die später dunkelbraunen Flecken der Blätter werden oft im Zentrum häutig und durch-

sichtig und schließlich durchlocht, während der gelbe chlorotische Kreis sich ausbreitet, wodurch die typischen „Halo“ Flecken der Amerikaner entstehen. Die Hülsen zeigen kreisrunde, wasserdurchtränkte Flecken, sog. Fettflecken, welche sich allmählich ausbreiten und anfangs eine grüne, später eine rote Farbe aufweisen. Die Bohnen der kranken Pflanzen sehen in den meisten Fällen normal aus, nur ausnahmsweise sieht man braune oder glanzlose Stellen. Jedoch wird durch Verwendung derartiger Bohnen als Saatgut die Verbreitung der Krankheit sehr gefördert.

Die Bakterien, welche abgerundete Stäbchen darstellen, $2{,}7 \times 0{,}7\ \mu$ groß mit 1—3 polaren Zilien, sind gramnegativ. Impfversuche an Bohnen ergaben positive Resultate. Es stellte sich heraus, daß die Bakterien besonders im Funiculus vorkommen und dann in die Samenhaut eindringen, nicht aber in das Innere der Keimblätter.

Zur Bekämpfung der Krankheit müssen die kranken Pflanzen entfernt und verbrannt werden und die gesunden Pflanzen mit kupferhaltigen Flüssigkeiten besprüht. Eine zweimalige Behandlung soll genügen. Diese Bekämpfung wird erfolgreich unterstützt durch Wechselwirtschaft.

Von verschiedenen Seiten ist versucht worden, resistente Varietäten von Stangen- und Buschbohnen zu züchten (Stapp, Zaleski), doch stellt die leichte Anfälligkeit der Bohnen für die Bakterienkrankheit diesem angestrebten Ziele große Schwierigkeiten entgegen.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Hartzell, A., A study of peach yellows and its insect vector. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. 1935. p. 183—208.)

Die als „peach yellows“ bezeichnete Pflanzenkrankheit befällt sehr oft endemisch die Pfirsichbäume (Prunus persica) und Verwandte in den gemäßigten Zonen von Nordamerika. Ihre Ätiologie ist immer noch zweifelhaft. Einzelne Symptome sprechen für ein Virus, z. B. die Tatsache, daß bei Pfropfung kranker Pflanzenteile auf gesunde Unterlagen derselben Art diese ebenfalls erkranken, eine einfache Übertragung, rein mechanischer Natur gelingt nicht. Sicher ist, daß durch Macropsis trimaculata, die von kranken Bäumen auf gesunde übergesetzt wird, das Virus weiterverbreitet wird. Die Übertragung ist jedoch nicht 100 proz. Das Alter der befallenen Pflanze scheint auch eine Rolle für die Anfälligkeit zu spielen, junge Bäumchen, die mit positiv erkrankten Zweigen okuliert wurden, zeigten die Krankheitserscheinungen ein bis zwei Jahre eher als solche Bäume, die mit normal erscheinenden Trieben von älteren Bäumen okuliert wurden. 47 verschiedene Insekten und Milben wie Graphocephala, Jassus, Erythroneura, Ormenis, Empoasca, Cicadula, Ceresa, Tibicine, Thrips, Tetranychus u. a. übertrugen das Virus nicht, ebensowenig konnte durch Pollen eine Verbreitung herbeigeführt werden. Prunus americana scheint für die Existenz von Macr. trim. erforderlich zu sein, denn in der Nachbarschaft des Auftretens dieser Pflanzenkrankheit war immer Pr. amer. zu finden, bei deren Vernichtung auch die Krankheit verschwand (abgesehen von dem Ausmerzen der befallenen Bäume).

Skallau (Berlin).

Abgeschlossen am 19. Dezember 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 95. No. 21|26.
Ausgegeben am 18. Februar 1937.

Nachdruck verboten.

Über Beziehungen zwischen Schweinehaltung und dem Vorkommen von Milchsäurestreptokokken in Milch und Milchprodukten.

Das „gewöhnliche" Milchsäurebakterium.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preuß. Versuchs- und Forschungsanstalt in Kiel.]

Von **Folke Bång**, Stockholm.

(Fortsetzung.)

Teil II.

Systematische bakteriologische Untersuchungen.

Die in den vorstehend geschilderten Versuchen isolierten Streptokokkenstämme wurden hauptsächlich unter Zugrundelegung des Schemas von Orla-Jensen systematisch geordnet. Während die Tab. 1a eine Übersicht über die in den einzelnen Versuchen isolierten Streptokokken gibt, enthalten die Tab. 1—8 die kulturellen Merkmale derselben.

Tabelle 1a.

Streptokokken isoliert aus:	Zahl der isolierten Streptokokken[1]				
	lactis	faecium	bovis	inulin	liquefac.
Faecesproben vom Schwein nach Fütterung mit Sauermilch	6	4	—	—	—
Faecesproben von Schweinen nach 12-tägiger Fütterung mit gekochter Milch	17	—	—	—	—
Faecesproben von Schweinen nach 8tägiger Fütterung ohne Milchnahrung (Fischmehl)	6	11	9	—	—
Faecesproben von Schweinen nach 7tägiger Fütterung mit Fischmehl ohne Milch, anschließend mit gekochter Milch . .	13	—	—	—	—
Faecesproben von Kuh und Kalb (Kalb gefüttert mit Sauermilch und Milchzucker)	2	—	2	3	2
Luft des Schweinestalls und Umgebung .	15	—	—	—	—
Saurer Futtermilch, Molke u. Saurewecker	7	—	—	—	—

[1]) Es wurden insgesamt 137 Streptokokkenstämme eingehend untersucht.

Tabelle 1.

Streptokokken-Stämme aus Faeces-Proben von Schweinen nach Fütterung mit Sauermilch.

Art der Gewinnung der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Starke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	Milchdicklegung n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	PH-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	70° C	Kaseinabbau	Gelatineverflüssig.	Lakmus-Milch-Probe 30° C	45° C	Janusgrunprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokkenspezies
Nach vor-	1 1	—	—	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		2	1	1	—					30°	—	—		—	t.	—	+		lactis
heriger An-	2 1	—	—	—	3	3	1	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		1	1	3	—	4,35	4,34		6,15	30°	—	—	1,20	—	t.	—	+	—	,,
reicherung	3 1	—	—	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	+	1	1	1	—	4,38	4,40		6,00	30°	—	—		—	t.	—	+	—	,,
der Faeces-	4 1	—	—	—	3	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		1	1	1	—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
proben in	5 1	—	—	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		1	1	2	—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
Milch	*	—	—	—	3	3	—	1	3	—	—	—	—	—	—	—	1																			
	6 1	3	2	—	3	3	3	2	3	—	3	2	—	—	2	—	2		2	1	1	—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
Nach dem	7 f	3	—	—	3	3	3	2	3	3	1	1	—	—	2	2	2	—	—	5	2	2	5,19	4,70	4,81	5,01	37°	+	+		—	a.	a.		+	faecium
„Direkt"-	8 f	3	—	—	3	3	3	3	3	3	2	2	—	—	2	2	3	—	—	5	2	2					37°	+	+		—	a.	a.		+	,,
Platten-	9 f	1	—	—	3	3	3	3	3	—	—	1	—	—	1	—	3	—	—	5	2	2	5,30	4,81	4,81	5,01	37°	+	—	0,34	—	a.	a.	—	+	,,
verfahren	10 f	—	—	1	3	3	3	3	3	—	—	3	1	—	—	2	3	—	—	6	2	2	5,22	4,66	4,89	5,20	37°	+	+	0,23	—	a.	a.	—	+	,,

Erlauterungen zu den Tabellen: Zuckerreihe: 1 = schwache Vergarung, 2 = Vergarung, 3 = starke Vergarung. Caseinabbau: Die Zahlen bedeuten mg Amino-N in 10 ccm Molke. Lackmusmilchprobe: t = typisch, a = atypisch, m = marmoriert.

Tabelle 2.
Streptokokken-Stämme aus Faeces-Proben von Schweinen nach zwolftägiger Futterung der Schweine mit gekochter Milch.

Art der Gewinnung der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Starke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	Milchdicklegung n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	p_H-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	70° C	Kaseinabbau	Gelatineverflussig.	Lackmus-Milch-Probe 30° C	45° C	Janusgrünprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokkenspezies
Nach vorheriger Anreicherung der in den Faeces-proben vorkommenden Bakterien in Milch	1	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—	—	1	—	—	—	1			1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		lactis
	2	2	—	—	3	3	—	2	3	—	—	2	—	—	2	—	2	+	2	1		—	4,36	4,34		6,15	30°	—	—	0,86	—	t.	—	+	+	,,
	*	3	3	—	3	3	—	3	3	—	2	2	—	—	3	—	2																			
	3	—	2	—	3	3	—	2	3	—	—	1	—	—	1	—	—	+	2	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+	—	,,
	4	—	2	—	3	3	—	2	3	—	—	1	—	—	1	1	1		2	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+	+	,,
	5	2	3	—	3	3	—	2	3	—	—	—	—	—	1	1	1	+	2	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	*	—	3	—	3	3	1	3	3	—	—	3	—	—	3	—	3																			
	6	3	—	—	3	2	—	3	3	—	—		1	—	2	—	3		2	1		—	4,23	4,37		5,99	30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	7	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—		—	—	—	—	3		2	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	8	—	3	—	2	3	—	3	3	—	—		1	—	2	—	2			1		—					30°	—	—		—	t.	—			,,
	9	3	2	—	3	3	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	3		1	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	10	1	1	—	2	2	—	3	3	—	—	—	—	—	2		3		2	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	11	1	1	—	3	2	3	3	3	—	—	—	—	—	2	1	3		1	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	12	1	—	—	2	3	2	3	3	—	—	—	—	—	2	—	3		2	1		—	4,36	4,22		6,10	30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	13	2	—	—	2	2	3	3	3	—	—	—	1	—	2	—	2		2	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	14	2	—	—	2	2	2	3	3	—	—	—	2	—	3	—	3	+	3	1		—	4,17	3,93		5,97	30°	—	—		—	t.	—	+	+	,,
	*	—	3	—	3	3	—	3	3	—	—	3	—	—	3	—	3																			
	15	—	1	—	2	3	2	3	3	—	—	—	—	—	—	—	3		1	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	16	—	—	—	2	3	2	3	3	—	—	—	1	—	—	—	—	+	2	1		—					30°	—	—	0,63	—	t.	—	+	—	,,
	*	—	—	—	3	3	3	1	3	—	—	3	—	—	1	—	1																			
	17	—	—	—	3	3	2	3	3	—	1	—	1	—	—	—	—		1	1		—	4,18	4,43		6,10	30°	—	—		—	t.	—	+		,,

Tabelle 3.
Streptokokken-Stämme aus Faeces-Proben von Schweinen nach achttägiger Fütterung der Schweine ohne Zugabe von Milchnahrung (mit Fischmehl).

Art der Gewinnung der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Stärke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	Milchdicklegung n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	p_H-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	70° C	*Kaseinabbau	Gelatineverflüssig.	Lackmus-Milch-Probe 30° C	45° C	Janusgrunprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokkenspezies
	18	—	—	—	3	3	2	3	2	2	3	2	3	—	—	—	—		—	2	1	1	5,80	4,31		5,08	37°					a.	a.			bovis
	19	—	—	—	2	3	2	3	2	3	3	2	3	—	—	—	—		—	2	1	1	6,00	4,89		5,01	37°	—	—		—	a.	a.			,,
Nach vor-	20	—	—	—	3	3	3	2	2	2	2	2	3	—	—	—	—		—	3	1	2					37°					a.	a.			,,
heriger An-	21	—	—	—	3	3	2	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		1	1	2	—					30°	—	—		—	t.	—	+		lactis
reicherung	22	—	—	—	3	3	3	3	2	2	3	2	3	—	—	—	1	—	—	3	1	2					37°	—	—	0,86	—	a.	a.	—	+	bovis
der in den	*	—	—	—	3	3	3	3	3	3	2	3	1	—	—	—	3																			
Faeces-	23	—	—	—	3	3	2	3	2	3	3	3	2	—	—	—	—		—	2	1	1	5,64	4,40		4,98	37°	—	—		—	a.	a.			,,
proben vor-	24	—	—	—	3	3	2	3	2	3	3	3	2	—	—	—	—		—	2	1	3					37°	—	—		—	a.	a.			,,
kommenden	25	—	—	—	3	3	2	3	2	2	3	3	3	—	—	—	—		—	2	1	1	5,51	4,31		5,05	37°	—	—		—	a.	a.			,,
Bakterien	26	—	—	—	2	2	—	2	3	2	3	3	3	—	—	—	—										37°	—	—		—	a.	a.			,,
in Milch	27	—	—	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		2	1	3	—					30°	—	—		—	t.	—	+		lactis
	28	—	—	—	3	3	2	2	3	3	3	3	3	—	—	—	2		—	2	1	1					37°	—	—		—	a.	a.			bovis
	29	—	—	—	3	3	—	3	—	—	1	1	—	—	—	—	—		2	1	1	—	4,32	4,50		6,05	30°	—	—		—	t.	—	+	—	lactis

Tabelle 4.
Streptokokken-Stämme aus Faeces-Proben von Schweinen nach achttagiger Futterung der Schweine ohne Zugabe von Milchnahrung (mit Fischmehl).

Art der Gewinnung der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Stärke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	Milchdicklegung n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	p_H-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	70° C	Kaseinabbau	Gelatineverflussig.	Lackmus-Milch-Probe 30° C	45° C	Janusgrunprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokken-spezies
Nach dem „Direkt"-Platten-verfahren	30	—	—	—	2	2	3	2	2	—	—	—	—	—	2	—	2	—	—	4	2	2					37°	+	+		—	a.	a.	—	+	faecium
	*	2	—	—	3	3	3	3	3	—	—	—	—	—	3	2	3																			
	31	—	—	—	2	2	2	3	2	—	—	—	—	—	—	2	2		—	6	2	2					37°	+	+			a.	a.			,,
	32	—	—	—	2	2	2	3	2	—	—	—	—	—	—	2	2	—	—	3	2	2	5,47	4,82	4,80	5,16	37°	+	+	0,23	—	a.	a.	—	+	,,
	*	3	—	—	3	3	3	3	3	—	—	—	—	—	2	—	3																			
	33	1	—	—	2	2	2	2	2	—	—	—	—	—	2	2	2	—	—	3	2	2	5,40	4,71	4,94	5,01	37°	+	+	0,34	—	a.	a.	—	±	,,
	*	2	1	1	3	3	3	3	3	—	—	1	—	—	2	—	3																			
	34	2	—	—	2	2	2	3	2	—	—	—	—	—	2	1	2		—	5	3	2					37°	+	—			a.	a.			,,
	35	1	—	—	3	2	2	2	2	—	—	—	—	—	2	2	2		—	5	2	2					37°	+	+			a.	a.			,,
	36	1	—	—	2	2	2	2	2	—	—	—	—	—	2	2	2	—	—	6	3	3					37°	+	+	0,46		a.	a.			,,
	*	3	—	1	3	3	3	3	3	—	—	1	—	—	2	—	2																			
	37	1	—	—	2	—	2	2	2	—	—	—	—	—	2	2	2		—	2	2	2	5,28	4,79	4,86	5,10	37°	+	+		—	a.	a.	—	+	,,
	38	2	—	—	3	2	3	3	3	—	—	—	—	—	2	2	2		—	3	3	2					37°	+	+		—	a.	a.	—		,,
	39	2	—	—	2	2	2	3	2	—	—	—	—	—	2	2	2		—	5	2	2					37°	+	+			a.	a.			,,
	40	2	—	—	3	2	3	3	3	—	—	—	—	—	2	—	2	+	2	1	1	—	4,29	4,38		6,01	30°	—	—			t.	—	+	±	lactis
	41	2	—	—	2	2	2	2	2	—	—	—	—	—	2	2	2		—	6	4	2					37°	+	+		—	a.	a.			faecium
	42	1	—	—	2	2	2	2	2	—	—	—	—	—	2	2	2		—	5	2	4					37°	+	+			a.	a.			,,
	43	2	—	—	3	2	2	3	3	—	—	—	—	—	2	1	2	+	1	1	2	—	4,18	3,85		5,98	30°	—	—			t.	—	+	±	lactis
	*	3	—	—	3	3	3	3	3	—	—	—	—	—	3	—	3																			
	44	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—		2	1	—	—					30°	—	—		—	t.	—			,,
	*	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—	—	—	—	—	—	1																			

Tabelle 5.

Streptokokken-Stämme aus Darminhalt von Schweinen. Fütterung der Schweine: 1 Woche lang unter Zugabe von Fischmehl; hernach Zugabe von gekochter Milch.

Herkunft und Art der Gewinnung der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Stärke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	Milchdicklegung n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	p_H-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	70° C	Kaseinabbau	Gelatineverflüssig.	Lackmus-Milch-Probe 30° C	45° C	Janusgrünprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokkenspezies
Aus Blinddarm nach Milch-Anreicherung	50	2	—	—	2	2	2	3	3	—	—		1	—	—	—	3	+	2	1	1	—	4,65	4,40	4,70	6,11	30°	—	—		—	t.	—	+	+	lactis
	*	3	3	—		3		3	3	—	—	3		—	3	—	3																			
	51	1	2	—	3	2	2	3	3	—	—		1	—	1	1	3	+	1½	1	1	—	4,60	4,45	4,50	6,10	30°	—	—		—	t.	—	+		..
Aus Dickdarm nach Milch-Anreicherung	52	2	2	—	3	3	2	3	3	—	—		1	—	2	—	3	+	2	1	1	—	4,64	4,40	4,71	6,05	30°	—	—	0,00	—	t.	—	+	+	..
	*	2	2	—	3	3	3	3	3	—	—	—	—	—	2	—	3																			
	53	2	—	—	3	3	2	3	3	—	—		—	—	—	1	3	+	1½	1	1	—	4,51	4,38	4,87	6,02	30°	—	—		—	t.	—	+	+	..
Aus Enddarm nach Milch-Anreicherung	54	2	—	—	2	2	2	3	3	—	—		—	—	—	—	3	+	1½	1	1	—	4,56	4,55	4,75	6,25	30°	—	—		—	t.	—	+	±	..
	55	2	—	—	2	3	2	3	3	—	—		1	—	—	1	3	+	2	1	2	—	4,80	4,53	4,70	6,02	30°	—	—		—	t.	—	+	±	..
	56	2	2	—	3	2	3	2	3	—	2	2	—	—	3	—	3	+	3	1	2	—	4,73	4,51	4,80	6,04	30°	—	—	0,18	—	t.	—	+	±	..
Aus Blinddarm von „Direkt“-Platten	57	2	2	—	3	2	3	3	3	—	1		—	—	2	—	3	+	2	1	1	—	5,00	4,44	4,65	6,20	30°	—	—		—	t.	—	+	+	..
	*	3	3	—	3	3	3	3	3	—	—	2	—	—	—	2	2	+	2	1	1	—														
	58	2	2	—	3	3	2	3	3	—	1		2	—	2	—	2	+	2	1	1	—	4,61	4,53	4,75	6,03	30°	—	—		—	t.	—	+	+	..
Aus Dickdarm v. „Direkt“-Platten	59	2	2	—	3	3	2	3	3	—	—	—	—	—	1	1	3	+	2	1	1	—		4,65	4,85		30°	—	—		—	t.	—	+	±	..
	*	2	2	—	3	3	3	3	3	—	2	2	—	—	1	—	3																			
	60	3	—	—	3	2	3	3	3	—	1	2	—	—	1	1	3	+	2	1	1	—	4,51	4,58	4,70	6,05	30°	—	—		—	t.	—	+	+	..
	*	3	3	—	3	3	3	3	3	—	—	2	—	—	1	—	3																			
Aus Dickdarm von „Direkt“-Platten	61	2	2	—	3	3	2	3	3	—	1	1	—	—	2	—	3	+	1½	1	1	—		4,60	4,70	6,08	30°	—	—	0,00	—	t.	—	+	±	..
	62	3	—	—	3	3	3	3	3	—	1	1	—	—	2	—	3	+	1½	1	1	—	4,52	4,50	4,80	6,10	30°	—	—		—	t.	—	+	±	..
	*	3	3	—		3	3	3	3	—	—	2	—	—	2	—	1																			

e 6.

Streptokokken-Stämme aus Faeces-Proben von Kuh und Kalb (Kalb gefuttert mit Sauermilch und Milchzucker).

Herkunft und Art der Gewinnung der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Starke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	Milchdicklegung n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei 30° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei 37° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei 45° C	p_H-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp.	p_H-Werte 30° C	p_H-Werte 37° C	p_H-Werte 45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	Hitzeresistenz 70° C	Kaseinabbau	Gelatineverflussig.	Lackmus-Milch-Probe 30° C	Lackmus-Milch-Probe 45° C	Janusgrunprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokken-spezies
Von Kuh nach Anreicherung in Milch + 0,20% Milchsäure	76	—	—	—	3	3	3	3	3	2	3	3	3	—	3	—	3	—	—	2	1	—	5,23	4,64	4,64	6,12	37°	—	—		—	a.	—	+	—	inulinaceus
	77	—	—	—	3	2	3	2	3	2	3	3	3	—	2	—	3	—	—	2	1	—	5,86	4,67	4,61	6,17	37°	—	—	1,94	—	a.	—	+	+	,,
	78	—	—	—	2	3	3	3	3	2	3	3	3	—	2	—	3	—	—	2	1	—	5,20	4,75	4,74	6,08	37°	—	—		—	a.	—	+	+	,,
	79	—	—	—	2	2	—	3	—	—	—	1	—	—	1	—	3	—	—	—	—	—	5,85	5,64	5,74	6,12	37°	—	—		—	a.	—	+	—	unechtes Milchsäurebakt. bovisähnl.
Vom Kalb „Direkt"-Platten	80	—	—	—	3	3	3	3	3	3	—	1	—	—	—	—	3	—	—	2	1	—	5,25	4,95	4,95	5,77	37°	—	—		—	a.	—	+	—	
	81	—	—	—	2	3	3	3	3	2	—	2	—	—	—	—	3	—	—	2	1	—	5,70	5,12	5,12	6,14	37°	+	—		—	a.	—	+	—	,,
Vom Kalb Milch-Anreicherung	82	—	3	—	3	3	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	2	—	1	1	2	—	4,28	4,34	5,04	6,07	20—30°	+	—		—	t.	—	+	±	lactis
	83	—	1	—	3	3	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	2	—	1	1	3	—	4,32	4,37	5,26	6,04	20—30°					t.	—	+	+	,,
Vom Kalb Anreicherung in Milch + 0,20% Milchsäure	84	—	—	1	3	1	3	3	2	1	—	3	—	1	3	3	3	—	2	1	1	1	4,69	4,73	4,82	5,30	30°	+	+	+	+	a.	a.	+	—	liquefac.
	*	—	—	1	3	1	3	3	2	—	—	1	—	1	2	3	3																			
	85	—	—	—	3	3	3	3	3	1	—	2	—	2	3	3	3	—	2	1	1	1	4,68	4,70	4,77	5,72	30°	+	+	+	+	a.	a.	+	—	,,

Tabelle 7.
Streptokokken-Stämme aus Schweinestall und Schweinestall-Umgegend (Luftinfektionskeime).

Einfangen der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Stärke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	Milchdicklegung nach n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	pH-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	70° C	Kaseinabbau	Gelatineverflüssig.	Lackmus-Milch-Probe 30° C	37° C	Janusgrünprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokken-spezies
Sterile Milch	86	—	—	—	3	3	2	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		1	1	2	—	4,21	4,32		6,12	30°	—	—		—	t.	—	+		lactis
5 Minuten	87	—	—	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	+	1	1	1	—	4,03	4,25		6,12	30°	—	—		—	t.	—	+	—	,,
imSchweine-	88	—	—	—	3	3	2	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—		2	1	3	—	4,21	4,32		6,17	30°	—	—		—	t.	—	+		,,
stall expo-	89	—	—	—	3	2	2	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		2	1	3	—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
niert	90	—	—	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		1	1	2	—	4,39	4,32		6,05	30°	—	—		—	t.	—	+		,,
	91	—	—	—	3	3	—	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		1	1	3	—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
Sterile Milch	92	—	—	—	3	2	2	3	—	—	—	—	—	—	2	—	2	+	3	1		—	4,13	4,38		5,78	30°	—	—		—	t.	—	+	—	,,
in der Um-	93	—	—	—	3	2	2	3	3	—	2	—	—	—	2	—	2	+	4	1		—	4,58	4,34		5,83	30°	—	—		—	t.	—	+		,,
gegend des	94	3	2	—	3	2	2	3	3	—	1	—	—	—	3	—	3		2	1		—	4,28	4,24		5,82	30°	—	—		—	t.	—	+		,,
Schweine-	95	3	2	—	3	2	2	3	3	—	2	2	—	—	3	1			3	1		—	4,27	4,24		5,78	30°	—	—		—	t.	—	+	—	,,
stalls expo-	96	3	2	—	3	2	2	3	3	—	—	3	—	—	3	—	3	+	3	1		—	4,29	4,20		5,86	30°	—	—		—	t.	—	+	±	,,
niert (Stäm-	*	1	1				3	3	3	1	2	2	—	—	2	—	2																			
me bei Zim-	97	—	—	—	2	2	2	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—		3	1		—	4,63	4,49		6,04	30°	—	—		—	t.	—	+		,,
mertemp. et-	98	2	2	—	3	3	3	3	3	—	2	2	—	—	2	3	3	+	2	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,
was langsam	99	—	—	—	3	3	2	3	3	—	—	—	—	—	3	—	2	+	2	1		—					30°	—	—	5,40	—	t.	—	+	±	,,
wachsend)	100	—	—	—	2	2	2	2	3	—	2	—	—	—	3	2	2		3	1		—					30°	—	—		—	t.	—	+		,,

Tabelle 8.
Streptokokken-Stämme aus saurer Futtermilch, Molke und Säurewecker.

Herkunft der Stämme	Stamm Nr.	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Stärke	Dextrin	Inulin	Glyzerin	Mannit	Sorbit	Salizin	n. 21 Tag. bei 5° C	Milchdicklegung nach 8 Tagen bei Zimmertemp.	30° C	37° C	45° C	P_H-Werte in Milch nach 8 Tagen Zimmertemp	30° C	37° C	45° C	Temperaturoptim.	Hitzeresistenz 60° C	70° C	Kaseinabbau	Gelatineverflüssig.	Lackmus-Milch-Probe 30° C	45° C	Janusgrünprobe	Aeskulinspaltung	Streptokokkenspezies
Aus Futtermilch	114	2	2	—	3	2	3	3	3	—	2	3	—	—	1	3	3	+	2	1		—	4,38	3,58		5,85	30°	+	—		—	t.	—	+	—	lactis
(Friedrichsort)	115	—	—	—	3	3	—	3	3	—	3	2	—	—	2	—	3	+	1	1		—	4,22	4,26		5,83	30°	+	—		—	t.	—	+	±	„
	116	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—	3	—	—	2	—	2	—	1	1	1	—	4,52	4,37	4,77	6,13	30°	+	—		—	t.	—	+	—	„
	117	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—	3	—	—	2	—	2	—	1	1	1	—	4,20	4,35	4,89	6,13	30°	+	—		—	t.	—	+	—	„
Aus Molke (Raisdorf)	118	—	1	—	3	3	—	3	3	—	3	3	—		3	—	3	+	2	1	2	—					30°	—	—		—	t.	—			„
	119	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—	—	—	—	2	1	1	+	1	1	1	—	4,10	4,20	5,15	6,15	30°	—	—		—	t.	—	+	—	„
	120	—	—	—	3	3	—	3	3	—	—	—	—	—	2	—	2	—	1	1	1	—					30°	—	—		—	t.	—	+	—	„
Aus Instituts-Säurewecker	121	—	—	—	3	3	3	3	3	—	3	3	—	—	—	—	3	—	2	1	1	3	4,67	4,30	4,51	5,02	30°	+	+			m.	÷	+	—	cremoris
	122	—	—	—	3	3	2	—	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	3	1	1	4	4,63	4,33	4,67	5,19	30°	+	+	3,76		m.	÷	—	—	„

I. Ist das „gewöhnliche" Milchsäurebakterium Str. lactis identisch mit den Enterokokken oder eine Umwandlungsform der Enterokokken oder anderer Bakterien und eine systematische Einteilung von Milchsäurestreptokokken möglich?

Dadurch, daß mehrere Forscher feststellten, daß Str. lactis weder im Darm der Kühe und Kälber noch bei Menschen vorkommt, wurde die Frage, woher Str. lactis in Milch stammt, von neuem aufgeworfen, da man nicht annehmen kann, daß Str. lactis von Milch in Milch auf direktem oder indirektem Wege weiter besteht; weiter erhob sich die Frage, ob Str. lactis nicht ein Darmstreptococcus sei, der sich nur an Milch angepaßt hat. Gewisse Forscher haben das „System" von Orla-Jensen nicht annehmen wollen, sondern sie haben zu beweisen versucht, daß der in Milch vorkommende Str. lactis identisch sei mit dem „gewöhnlichen" Darmstreptococcus (Str. faecium). Manche Autoren meinen, daß eine systematische Einteilung der Milchsäurebakterien gar nicht möglich sei.

Gundel, der bei seinen Forschungen zu Unterscheidungen die medizinische Methodik anwendet und nicht Orla-Jensens Methodik, kommt z. B. zu folgendem Ergebnis: „Wir haben .... gesehen, daß zwischen Milchsäurestreptokokken und Enterokokken außerordentlich enge Beziehungen bestehen. Man ist zweifellos geneigt, von einer Identität der beiden zu sprechen."

Keitel kommt auf Grund der Ergebnisse, nach denen die Zuckervergärung bei den Milchsäurestreptokokken nicht immer konstant ist, zu der Schlußfolgerung, daß das System von Orla-Jensen so gut wie wertlos sei und fragt: „Wie steht es mit den Orla-Jensen Spezies?" Er antwortet: „Sind diese Befunde nicht schon ein Beweis, daß die Arten alle ineinander überzugehen vermögen, daß gar nicht mehr daran zu denken ist, von einzelnen Spezies zu sprechen, und daß schließlich alle Milchsäurestreptokokken auf einen Ausgangspunkt zurückzuführen sind, von wo sie sich immer neu ergänzen? Hier liegt das Rätsel des Str. lactis, der sich unter all diesen Arten mehr oder weniger zu verbergen scheint." Keitel gibt keine Auskunft darüber, wo der Ausgangspunkt für Str. lactis zu suchen ist, was übrigens sehr verständlich erscheint, da eine solche Frage leicht zu der weiteren Frage verleitet, welches der Ausgangspunkt aller Lebewesen überhaupt sei.

Demeter (1) ist ähnlich wie Keitel betreffs der Milchsäurestreptokokkenfrage geneigt, bedeutsame Schlußfolgerungen aus verhältnismäßig geringfügigem Anlaß zu ziehen. Demeter hat gefunden, daß Faecium-Stämme von Mensch und Kalb bei einer ersten Prüfung eine atypische Lackmusprobe ergeben, bei späterer Wiederholung aber typische. Dies, meint Demeter, sei ein Beweis dafür, daß Str. faecium identisch sei mit Str. lactis. Jedenfalls sei Str. lactis eine an die Verhältnisse in der Milch angepaßte Variation von Str. faecium. Eine systematische Einteilung der Milchsäurebakterien wird von Demeter für ziemlich unmöglich gehalten. Er sagt: „Eine prinzipielle Trennung zwischen den typischen Milchsäurestreptokokken und den Faecalstreptokokken läßt sich soweit nach unseren Untersuchungen nicht durchführen."

Bei den hier vorgenommenen Untersuchungen über die Milchsäure-Streptokokken konnte Verf. die Frage nicht umgehen, wie weitgehend eine Systematisierung der Milchsäure-Streptokokken möglich ist, wobei natürlich auch die Frage, ob Str. lactis eine Umwandlungsform des Faecalstreptococcus sei, der sich in Milch angepaßt hätte, was von mehreren Forschern behauptet wird, nahe lag, oder ob Str. lactis eine Umwandlungsform von anderen Bakterienarten sei.

Die Ansicht Keitels, daß das System von Orla-Jensen so gut wie wertlos sei, kann vom Verf. nicht geteilt werden. Man hat den Eindruck, daß Keitel sehr durch Demeters Auffassung beeinflußt wurde.

Wenn Orla-Jensen seine Milchsäurebakterien-Stämme systematisch einordnet, so wendet er nicht nur die Kohlehydratvergärung an, sondern

er zieht darüber hinaus Untersuchungsmethoden verschiedener Art hinzu. Die Zuckerreihe ist nur ein Glied in der Serie der Proben, und sie ist betreffs Str. lactis kaum als die wichtigste der Proben anzusehen.

Jeder, welcher die in Orla-Jensens Tabellen unter den verschiedenen Spezies eingeordneten Milchsäurestreptokokken nachprüft, findet, daß hinsichtlich der Zuckerreihe von Orla-Jensen selbst eine ziemlich große Variationsbreite zugelassen ist. Außerdem hebt Orla-Jensen selbst hervor, daß das Gärvermögen eines Stammes nicht immer konstant ist und von der Zusammensetzung des Nährbodens beeinflußt wird.

Um einen guten Überblick über die Verhältnisse der „gewöhnlichen“ Darmstreptokokken (Str. faecium) und der „gewöhnlichen“ Milchstreptokokken“ (Str. lactis) zueinander zu erhalten, ist in Tab. I ein Schema über die beiden Arten aufgestellt. Aus derselben geht hervor, daß in gewisser Hinsicht Übereinstimmung zwischen beiden Arten besteht, in anderer Hinsicht dagegen Unterschiede. Die Unterschiede sind maßgebend für die Artunterscheidungen, nicht die Übereinstimmung.

Tabelle I.

	Streptococcus lactis	Streptococcus faecium
Kohlehydratvergärung kann ziemlich gleich sein	Manchmal gute Xylosevergärung	Niemals ausgeprägte Xylosevergärung
Optimale Temperatur . . .	30°	37°
Temperaturminimum . . .	unter 7°	unter 7°
Temperaturmaximum . . .	bei 45°	über 45°
Milchdicklegungszeit 20° . .	1—3 Tage	8—14 Tage und darüber
„ 30° . .	20 Stunden	2—6 Tage und darüber
„ 37° . .	1—2 Tage und darüber (im allg. innerhalb 24 Std.)	2—4 Tage
„ 45° . .	gerinnt nicht	2 bis mehrere Tage
p_H in Milch nach 8 Tagen bei verschied. Temperaturen	am niedrigsten bei 20 und 30°	am niedrigsten bei 30 und 37°
Hitzeresistenz	abgetötet bei 60—65°	nicht abgetötet bei 65—70°
Kaseinabbau (Aminostickst.)	wechselnd	sehr wenig
Gelatineverflüssigung . . .	nicht verflüssigt	nicht verflüssigt
Lackmusmilch	typisch (Heim 1 a)	atypisch
Milchkoagulum 30°	schön geleeartig, appetitliches	loses, unappetitliches
Janusgrünprobe	stets positiv	positiv oder negativ
Aesculinspaltung	positiv oder negativ	meist negativ

Es kann hier folgendes angeführt werden: Bei Abschluß der Laboratoriumsarbeit war Verf. infolge einer Reise 3 Wochen vom Laboratorium abwesend; vor der Abreise wurden alle Stämme in sterile Magermilch mit Kreidezusatz übergeimpft und in den Kühlschrank gestellt (5—8°). Nach Rückkehr von der Reise wurde festgestellt, daß alle Lactis-Stämme die Milch koaguliert hatten, alle Stämme der Arten Str. faecium und Str. bovis dagegen nicht. Gruppe I (Str. lactis) hatte sich also deutlich von den beiden übrigen Gruppen ausgesondert. Um zu kontrollieren, ob die Faecium-Stämme sich überhaupt bei 5—8° zu entwickeln vermögen, wurden mit diesen Stämmen beimpfte Lackmusmilchröhrchen bei

dieser Temperatur aufbewahrt. Daß auch die Faecium-Stämme, wenn auch sehr langsam, noch bei 5—8° wachsen konnten, war an dem Farbumschlag zu erkennen.

Sach konnte ohne größere Schwierigkeiten Str. faecium-Stämme, die er aus Faeces von Menschen und Kühen isoliert hatte, von Lactis-Stämmen aus Milch mit Hilfe von Orla-Jensens System und auch der Lackmusmilchprobe trennen. Baumann sagt, seine Untersuchungen zeigten, daß eine Einordnung in Orla-Jensens System möglich sei, wenn er auch hervorhebt, daß gewisse Schwierigkeiten vorhanden sein können, wenn es gelte, sehr nahe verwandte Arten in das System einzugliedern. Das gleiche konnte vom Verf. festgestellt werden.

Daß auch unter den Medizinern keine einheitliche Auffassung über die Streptokokken herrscht, geht z. B. aus den Angaben von Meyer und Schönfeld hervor: „Von einer völligen Identität der Milchsäurestreptokokken in ihrer Gesamtheit mit Enterokokken oder gar mit Viridansstreptokokken kann nicht die Rede sein."

In einer späteren Arbeit schreibt Meyer: „Es ist widersinnig, die Enterokokken mit den Milchsäurestreptokokken zu identifizieren."

Sherman und Stark meinen, man könne Str. lactis und Str. faecium auf folgende Art unterscheiden: Str. lactis: Maximaltemperatur 41—43°, kein Wachstum bei 45°, Erhitzung in steriler Milch bei 65° 30 Min. tötet ab, kein Wachstum auf Milchzuckeragar bei p_H 9,6, kein Wachstum auf Milchzuckeragar mit 6% Natriumchlorid.

Str. faecium: Maximaltemperatur 40—52°, gutes Wachstum bei 45°, Erhitzung auf 65° 30 Min. wird ertragen, gutes Wachstum auf Milchzuckeragar bei p_H 9,6, gutes Wachstum auf Milchzuckeragar mit 6,5 Natriumchlorid.

Daß Demeter selbst der völligen Identität von Str. lactis und Str. faecium nicht so gewiß ist, kann man aus seiner Bemerkung entnehmen, daß Str. lactis nichts anderes sei als höchstens eine an Milch mehr oder minder angepaßte Variante des gewöhnlichen Darmstreptococcus (Str. faecium). Dagegen ist er um so mehr davon überzeugt, daß Str. lactis ein Umwandlungsprodukt von Str. faecium sei. Folgende Äußerung Gundels nimmt er zum Anlaß einer Erwiderung: „Auf Grund dieser Befunde möchten wir es als sehr wahrscheinlich bezeichnen, daß es sich bei Enterokokken um Milchsäurestreptokokken handelt, deren kulturelles Verhalten durch Standortwechsel sich etwas verändert hat." Demeter (1) kehrt diese Theorie um, indem er sagt: „Der natürliche Standort der echten Milchsäurestreptokokken ist der menschliche Darm. Gelangen sie in Milch und werden sie von dort immer weiter übertragen, so tritt eine gewisse Anpassung an diese neue Umgebung ein und das Resultat ist ein auf Milch spezialisierter Organismus, nämlich der Str. lactis." Zu einem ähnlichen Schluß kommt er auch auf Grund seiner eigenen Untersuchungen.

Da Demeters Auffassung einen gewissen Einfluß auf spätere milchbakteriologische Arbeiten ausgeübt hat, soll hier etwas näher auf seine Arbeit zur Frage des Str. lactis-faecium eingegangen werden.

Wie aus vorliegender Arbeit hervorgeht, wurde eine große Menge von Stämmen des Str. faecium von Schweinen, Kühen und Kälbern isoliert. Viele dieser Stämme wurden mehrere Monate lang und oft über ein Jahr in Milch gezüchtet, behielten aber trotzdem ihre für Str. faecium typischen Eigenschaften bei. Es ist allerdings richtig, daß die Faecium-Stämme zuerst eine atypische, später eine mehr typische (Heim 1 b) Lackmusprobe ergaben, gerade so wie mehrere Stämme Demeters. Aber das für Str. faecium typische, langsame Entwicklungsvermögen in Milch bei 30° und darunter, sowie ihr Temperaturoptimum bei 37° und auch gutes Wachstum bei 45° haben die hier isolierten Faecium-Stämme beibehalten. Dies alles deutet mehr darauf hin, daß Str. faecium sich nicht in Milch in Str. lactis umwandelt, wie Demeters Ansicht ist, die sich allein auf die Lackmusprobe stützt. Im übrigen deuten die vom Verf. ausgeführten Versuche an, daß Str. lactis und Str. faecium nicht Übergangsformen voneinander sind. Auf den Direktplatten aus Faeces von Schweinen, die mit Milch gefüttert waren, waren reichlich Kolonien

von Str. faecium, aber nur wenige von Str. lactis gewachsen. Auf „Platten via Milch“ dagegen von den gleichen Schweinefaeces traten ausschließlich Kolonien von Str. lactis, aber überhaupt keine von Str. faecium auf. Wenn man nach den Ergebnissen der Direktplatten urteilt, so kommt Str. faecium in den Schweinefaeces sehr reichlich vor, aber das Ergebnis der „Platten via Milch“ zeigt, daß Str. faecium trotz seines reichlichen Vorkommens in Faeces sich in der Milch gegenüber Str. lactis überhaupt nicht durchzusetzen vermag. Dies Verhalten spricht nicht dafür, daß Str. faecium und Str. lactis gleiche Arten sind, oder daß sich Str. faecium in Milch in Str. lactis umwandeln kann. Um die Entwicklungsgeschwindigkeit in Milch bei Zimmertemperatur an Stämmen festzustellen, die ein Jahr in Milch gezüchtet waren, wurde folgender Versuch ausgeführt:

Von 4 Milchröhrchen, von denen zwei mit je einem Faecium-Stamm und zwei mit je einem Lactis-Stamm beimpft und bis zur eintretenden Koagulation der Milch bebrütet waren, wurde je eine Serie von Verdünnungen mit sterilem Wasser hergestellt. Von der größten Verdünnung eines jeden der 4 Stämme wurde je $^1/_{10}$ ccm einer Kulturflasche mit 80 ccm steriler Magermilch hinzugesetzt. Die Flaschen wurden bei Zimmertemperatur bebrütet. Um zu kontrollieren, wie groß die hinzugesetzte Keimzahl in jeder Kulturflasche war, wurden mit einem Zehntel ccm aus je einer Flasche Platten angelegt und die Kolonien nach Bebrütung ausgezählt.

Nach einem und nach zwei Tagen wurden wiederum die Keimzahlen der 4 Kulturflaschen mit Milch auf Chinablau-Milchzuckeragarplatten bestimmt. Aus Tab. J sind die Ergebnisse dieses Versuches zu ersehen.

Tabelle J.

Stamm-Nr.	Art Strept.	Zu 80 ccm Milch hinzugesetzte Keime	Anzahl Keime per ccm Milch nach 1 Tag	Anzahl Keime per ccm Milch nach 2 Tagen	Gesamtzuwachs per zugesetzten Keimen nach 2 Tagen
1	Faecium	76	2 000	140 000 000	150 000 000
2	,,	43	—	50 000 000	80 000 000
3	Lactis	1	560 000	1 600 000 000	130 000 000 000
4	,,	1	670 000	2 100 000 000	168 000 000 000

Die Zahlen der Tab. J deuten nicht darauf hin, daß Str. faecium geneigt ist, selbst nach längerer Züchtung in Milch in Str. lactis überzugehen. Während die beiden Faecium-Stämme nach 2 Tagen auf eine Zahl von 140 000 000 bzw. 50 000 000 Keimen in 1 ccm Milch angewachsen waren, waren die Keimzahlen der Lactis-Stämme auf 1,6 und 2,1 Milliarden gestiegen. Dividiert man 140 000 000 durch 76, der ursprünglich hinzugesetzten Keimzahl (wir rechnen mit der Keimzahl nach den Ergebnissen der Platten), so ergibt sich eine Zahl von ca. 2 000 000, die somit die durchschnittliche Vermehrung einer Zelle angibt. Der andere Faecium-Stamm hatte, wie der Quotient aus 50 000 000 und 43 ergibt, eine Vermehrung von ca. 1 000 000 Zellen innerhalb 48 Std., berechnet auf 1 ccm der Kultur. Für Str. lactis betrug die Zellvermehrung in einem Fall 1,6 Milliarden und im anderen Fall 2,1 Milliarden innerhalb 48 Std., berechnet auf 1 ccm der Kultur. Berechnet man diese Zahl auf die gesamte Kulturmenge, so erhält man bei Str. faecium für einen Stamm eine Vermehrung von ca. 150 000 000, für den anderen Faecium-Stamm ca. 80 000 000 pro Zelle innerhalb 48 Std. und für Str. lactis bei einem Stamm ca.

130 Milliarden, bei dem anderen Stamm ca. 168 Milliarden pro Zelle nach 48 Std. Daß diese Untersuchung keine exakten Zahlen ergeben kann, ist selbstverständlich, aber die Fehlerquellen sind für alle 4 Stämme die gleichen. Man bekommt hierdurch einen guten Überblick über die Wachstumsgeschwindigkeit.

In welchem Maße die verschiedenen Arten die Fähigkeit haben, ineinander überzugehen, weiß man hinsichtlich der Milchsäurebakterien wohl noch nicht.

Wenn Gundel als Beweis dafür, daß Milchsäurebakterien ineinander übergehen können, hervorhebt, daß er nach Fütterung von Mäusen mit einer Reinkultur bestimmter Milchsäurestreptokokken eine Streptokokkenart mit anderen Eigenschaften als der verfütterten Art aus ihren Faeces isoliert habe, so ist dies kein Beweis dafür, daß es sich in beiden Fällen um die gleichen Streptokokken gehandelt hat. Demeter (1) macht nach unserer Ansicht einen großen Fehler, wenn er schon vor Beginn seiner Untersuchungen eine bestimmte Position einnimmt und folgende Erwartung ausspricht: „Als Antwort auf unsere Fragestellung erwarten wir entweder, daß sich Str. lactis normal aus Darminhalt isolieren läßt oder daß der Str. lactis mit dem gewöhnlichen Darmstreptococcus, Str. faecalis oder auch Enterococcus genannt, identisch ist. Eine Erklärung in einer dieser beiden Richtungen war mit Bestimmtheit zu erwarten."

Demeter findet Str. lactis nicht im Darm, wohl aber Str. faecium, und er stellt fest, daß Str. faecium zunächst eine atypische Lackmusprobe ergibt, später aber dazu übergeht, eine mehr typische Lackmusprobe hervorzurufen. Auf Grund dieses Verhaltens des Str. faecium gegenüber der Lackmusprobe stellt Demeter fest, daß Str. faecium sich in Milch in Str. lactis umwandelt. Dies geht deutlich aus seinem Schlußergebnis hervor, in dem er sagt: „Der sog. „echte" Milchsäurestreptococcus ist nichts anderes als höchstens eine an Milch mehr oder weniger angepaßte Variante des gewöhnlichen Darmstreptococcus, und der Name Str. lactis, wie man ihn bis jetzt gebraucht hat, bezeichnet lediglich eine besonders an Milch angepaßte „Standortsform" des Faecalstreptococcus. Diese Anpassung gibt sich hauptsächlich kulturell dadurch zu erkennen, daß die bei manchen Stämmen vorhandene Unfähigkeit, eine typische Lackmusmilchprobe zu geben, im Verlaufe der außerhalb des Darmes stattfindenden, zunächst ungewohnten „Milchkultur" allmählich verlorengeht."

Sach, der sich übrigens sehr kritisch gegenüber Demeters Einstellung zur Milchsäurestreptokokkenfrage verhält, hat Milchsäurestreptokokken aus Sammelmilch isoliert, die er für eine Übergangsform von Str. faecium in Str. lactis oder umgekehrt hält. Er bezeichnet diese Stämme als Str. faecium-lactis und sagt, der Name solle nicht einen neuen Artnamen darstellen, sondern nur als Kennzeichen für eine Übergangsform von Str. faecium zu Str. lactis oder umgekehrt dienen. Hierbei kann erwähnt werden, daß die Bezeichnung Str. faecium-lactis nicht neu ist, sondern schon vorher u. a. von Keitel gebraucht wurde. Daß Sachs Stämme, die aus bei 37° bebrüteter Sammelmilch stammten und sich wie Str. faecium verhielten, 70° ¼ Std. nicht vertrugen, macht die Annahme, daß es sich um eine Umwandlungserscheinung handelt, keineswegs erforderlich; näher liegt die Annahme, daß die Resistenz bei 70° unter irgendwelchen Einflüssen nachgelassen hatte. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß es sich um eine ganz neue Spezies, eine Zwischen-, nicht Übergangsform, handelte, die noch nicht in das System eingereiht ist.

Verf. hat auch Stämme isoliert, die eine Optimaltemperatur bei 37° hatten, 60° 30 Min. vertrugen, jedoch nicht 70° 1/4 Std. und mit Str. faecium weitgehende Übereinstimmung zeigten, nicht aber mit Str. lactis, denn sie hatten in Milch bei 30° und darunter ein schlechtes Entwicklungsvermögen.

Zu einer der unbedingten Voraussetzungen für die Benennung eines Stammes mit der Artbezeichnung Str. lactis gehört u. E. seine Fähigkeit, in Sammelmilch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit bei 30°, Zimmertemperatur und darunter aufzuweisen. Str. lactis wird ja gerade deshalb als gewöhnliches „Milchsäurebakterium" bezeichnet, weil es sich in der Praxis durch sein rasches Säuerungsvermögen zu erkennen gibt. Man könnte

sich natürlich auch Lactis - Stämme vorstellen, die infolge Abschwächung ihre ursprüngliche hohe Wachstumsgeschwindigkeit eingebüßt haben. Aber wenn man nicht weiß, ob es sich wirklich um abgeschwächte Stämme von Str. lactis handelt, kann man ihnen auch kaum diese Artbezeichnung zulegen.

Da die Theorie, nach der sich die gewöhnlichen Milchsäure-Streptokokken aus den gewöhnlichen Darmstreptokokken rekrutieren, nicht befriedigt, gibt es auch Autoren, die eine Lösung dieses Problems auf andere Weise versucht haben. So ist z. B. Hüttig bei seinen Untersuchungen zu dem Resultat gekommen, daß das Bacterium herbicola Burri et Düggeli sich in Milch in gewöhnlichen Str. lactis umwandeln könnte, und berichtet weiter, daß es ihm gelungen wäre, durch Erhitzung auf 58° Str. lactis in herbicola zu überführen und umgekehrt.

Mack hat später Untersuchungen über Herbicola angestellt; es ist ihr jedoch nicht gelungen, Bact. herbicola in Str. lactis umzuwandeln, obgleich sie die gleiche Methode anwandte wie Hüttig. Vorläufig ist es vielleicht am besten, sich zu dem „Kreislauf" herbicola-lactis Hüttigs abwartend zu verhalten.

In einer neueren Arbeit meint Storck, Str. lactis durch „Passagen" in Str. faecium umgewandelt zu haben. Da seine Arbeit noch nicht erschienen ist, will ich ihm nicht vorgreifen.

Wenn man die Ansicht Gundels, die Darmstreptokokken seien umgewandelte Milchsäurestreptokokken, mit der gegenteiligen Auffassung Demeters, die gewöhnlichen Milchsäurestreptokokken Str. lactis, seien umgewandelte Darmstreptokokken, Str. faecium, vergleicht, so muß man bei näherer Betrachtung erkennen, daß Gundels Theorie logischer ist als die Demeters. Weder Mensch noch Tier haben bei der Geburt Bakterien im Darm.

Schieblich (Mangold) sagt: „Bei und kurze Zeit nach der Geburt erweist sich der Magen und Darmkanal des Menschen und Tieres bakterienfrei. Aber schon vor der ersten Nahrungsaufnahme finden sich Bakterien ein. Als Eintrittspforte dient ihnen nicht nur die Mundöffnung, sondern auch die Afteröffnung."

Hieraus weiß man, daß die ursprüngliche Herkunft der Darmbakterien nicht im Darm selbst zu suchen ist, sondern in der Außenwelt.

Doch es erscheint am ratsamsten, die Frage nach der ursprünglichen Herkunft des Str. lactis wie allen anderen Bakterien gar nicht zu erörtern. Wir müssen uns darauf beschränken, zu erforschen, wo die heutigen Infektionsquellen liegen und woher heute die Rekrutierung erfolgt. Jedoch sei hervorgehoben, daß bislang nichts darauf hinweist, daß der Str. lactis im Säuglingsdarm zu Hause ist.

Wie schon vorher gesagt ist, wurden Untersuchungen der Faeces von 4 Saugferkeln ausgeführt. Dabei konnten keine Stämme der Gruppe I (Str. lactis) isoliert werden. Weil dagegen Str. lactis aus Faeces von Schweinen (nicht Saugferkeln), die mit Kuhmilch gefüttert waren, vorgefunden wurde, könnte die Meinung auftauchen, Str. lactis wäre nicht fähig, sich in Schweinemilch zu entwickeln. Um dies zu entscheiden, wurden ein paar Mutterschweine gemolken und die Schweinemilch in Reagenzgläsern sterilisiert. Die sterilisierte Schweinemilch wurde mit Str. lactis und Str. faecium beimpft. Beide Arten konnten sich in der Milch entwickeln. Es ergab sich dann die Frage, warum man wohl Str. lactis aus Faeces von Schweinen, die mit Kuhmilch gefüttert waren, isolieren konnte, aber nicht aus Faeces von Ferkeln, die mit Muttermilch ernährt

waren. Zur Beantwortung dieser Frage hätten umfangreiche Untersuchungen angestellt werden müssen, die ein allzu großes Anwachsen dieser Arbeit zur Folge gehabt hätte. Man darf vielleicht annehmen, daß die Ursache für die genannte Tatsache in hemmenden oder abtötenden Einflüssen im Ferkeldarm zu suchen ist. Dagegen kamen im Ferkeldarm sehr reichlich Thermobakterien vor.

Henneberg (4), der umfassende Untersuchungen über die Darmflora von Säuglingen (Menschen), Kälbern und Lämmern ausgeführt hat, sagt folgendes: „Da auch im Fohlen und wohl auch in jedem Saugferkel die Thermobakterien die wichtigste Milchsäurebakterienart ist und da auch der Str. lactis bisher nirgends als ständiger Darmbewohner gefunden wurde, scheinen die uns hier interessierenden Verhältnisse auch sonst sehr ähnlich wie beim Menschen zu sein."

Die Untersuchungen über Saugferkel lassen nicht gerade darauf schließen, daß Säuger eine Infektionsquelle für Str. lactis sind.

Da die Möglichkeit vorlag, daß Str. faecium nach Verlassen des Darms, jedoch vor Eintritt in die Milch, auf dem Infektionsweg eine Umwandlung durchmachen könnte, wurden, um möglicherweise Klarheit hierüber zu erhalten, folgende Versuche ausgeführt.

Mehrere Faeces-Proben von Kühen und Schweinen, die kein Milchfutter erhalten hatten, wurden vom Versuchsgut abgeholt. Von jeder Faecesprobe wurde in mehrere sterile Kulturflaschen etwa ½ g Faeces gebracht und mit sterilen Glasstäben auf die Wandungen gestrichen und verteilt. Hierbei wurden die Flaschen zur Vermeidung einer Luftinfektion waagerecht gehalten. Die Wattestopfen wurden vor dem Einsetzen gut abflambiert. Dann wurden Flaschen verschiedenen, natürlichen Temperaturschwankungen bei Tag und Nacht ausgesetzt. Der Kot trocknete natürlich an den Glaswandungen fest. In verschiedenen, bestimmten Zeitabständen wurden die Kulturflaschen darauf mit steriler Milch gefüllt und bei 30° im Thermostaten bebrütet. Einige Flaschen blieben vor dem Füllen mit steriler Milch bis zu einem ½ Jahr stehen.

Stets wurde die Milch von Fäulnisbakterien, Sporenbildnern und Buttersäurebazillen, jedoch niemals von Milchsäurebakterien angegriffen. Dies Ergebnis deutete nicht darauf hin, daß die Enterokokken (Fäkalstreptokokken) in der Zeit zwischen Verlassen des Darmes und Infizierung der Milch eine Umwandlung in Str. lactis durchmachen können. Vielleicht entsprechen die vorgenommenen Untersuchungen nicht ganz den praktischen Verhältnissen. Bei den Luftanalysen im isolierten Kuhstall wurde gezeigt, daß auch in der praktischen Wirklichkeit Enterokokken nicht in der genannten Zwischenzeit in Str. lactis übergehen. Ohne zu der Frage, ob Str. lactis eine Umwandlungsform von Str. faecium ist oder umgekehrt, Stellung zu nehmen, kann man doch feststellen, daß die ausgeführten Untersuchungen mehr darauf hindeuten, daß jede der beiden genannten Arten eine Spezies für sich ist und nicht eine Übergangsform von der einen in die andere Art. Weder die Annahme Gundels, daß Str. lactis sich im Darm in „Enterokokken" umwandelt, noch Demeters Behauptung, daß Enterokokken sich in Milch in Str. lactis umwandeln, ist irgendwie bewiesen. Doch kann hier zugegeben werden, daß Gundels Theorie eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich hat. Darauf, daß eine Umstellung von Str. lactis im Darm vor sich gehen kann, könnte vielleicht u. a. die Tatsache in geringem Maße hindeuten, daß die Stämme, die von Schweinen mit Sauermilchfutter isoliert wurden, eine etwas abweichende Zuckervergärung gegenüber solchen Stämmen aufweisen, die von Schweinen, welche nur gekochte Milch erhielten, isoliert wurden (vgl. Tabellen). Aber die Frage, ob Str. lactis sich in Str. faecium umwandeln kann oder umgekehrt, ist

— wie man berechtigterweise sagen kann — keineswegs im bejahenden Sinne geklärt.

Demeters (2) Ergebnis aus seinen 8 Jahre lang in Milch gezüchteten Faecalstreptokokken deutet nach unserer Auffassung darauf hin, daß Str. lactis und die Faecalstreptokokken deutlich verschiedene Arten sind. Wenn Demeters Stämme ihren anfänglichen Charakter beibehalten haben und nach 8 Jahren in Milch gezüchtet nur eine „Verwandtschaft" mit Str. lactis zeigen, dann kann kaum von einer Umwandlung von Str. faecis in Str. lactis in Milch gesprochen werden, wie Demeter es tut.

1. Diskussion.

Str. lactis wird deshalb als „gewöhnliches" Milchsäurebakterium bezeichnet, weil es in den meisten Fällen die Ursache der Milchsäuerung ist. Ob es wirklich so allgemein und reichlich verbreitet ist, wie vielfach angenommen wird, soll hier etwas näher eingegangen werden.

Bei keinem untersuchten Lebewesen wurde jemals Str. lactis als Darmbewohner gefunden, außer beim, wie hier gezeigt ist, mit Kuhmilch gefütterten Schwein. Nicht einmal bei Säuglingen oder bei jungen, mit Muttermilch ernährten Tieren, hat man Str. lactis als Darmbewohner nachweisen können. Verf. konnte sogar bei Saugferkeln nie Str. lactis im Darm finden, obwohl das Muttertier mit Kuhmilch gefüttert wurde und im eigenen Darm Str. lactis beherbergte.

Aus den „Luftinfektionsversuchen" im isoliert liegenden Kuhstall in Kiel ging mit aller Deutlichkeit hervor, daß der Kuhstall keine Heimat für das „gewöhnliche" Milchsäurebakterium darstellt. Man darf wohl annehmen, daß die Luft in einem Stall in ihrem Keimgehalt einen Durchschnitt der Gesamtflora der im Stall befindlichen Keime von Kühen, Futter, Streu usw. darstellt. Die alte Vorstellung, daß Str. lactis von Kühen oder aus dem Kuhstall stammt, muß durch die hier ausgeführten Untersuchungen als vollständig widerlegt gelten. Daß der isoliert in der Stadt Kiel liegende Kuhstall sich anders verhalten sollte als andere Kuhställe, ist nicht gut denkbar. Während der Zeit, in der diese Arbeit durchgeführt wurde, konnte in dem Kuhstall in Friedrichsort Str. lactis aus der Luft isoliert werden. Neben diesem Kuhstall lag jedoch der Schweinestall und es ist wohl anzunehmen, daß der größte Teil der Lactis-Keime durch die Luftbewegung herübergetragen wurde. Hiermit soll natürlich nicht gesagt sein, daß Str. lactis in einem isolierten Kuhstall überhaupt nicht vorkommen kann, sondern lediglich, daß der Kuhstall keine primäre Quelle für Str. lactis darstellt.

Die Ergebnisse der hier vorgenommenen Luftuntersuchungen sprechen auch nicht gerade dafür, daß Enterokokken in Milch sich in Str. lactis umwandeln, wie Demeter (1) meint. Enterokokken konnten ohne Schwierigkeit im Kuhstall isoliert werden, aber es konnte niemals bemerkt werden, daß diese sich in Milch in Str. lactis umwandelten.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß Str. lactis hinsichtlich seiner Verbreitung mit Ausnahme des Vorkommens in Milch durchaus nicht so gewöhnlich ist, wie man im allgemeinen glaubt. Str. lactis muß vielmehr als ein verhältnismäßig selten in der Natur vorkommendes Bakterium betrachtet werden. Sogar an dem Ort der Milchgewinnung, dem Kuhstall, kann Str. lactis unter Umständen äußerst selten sein. Daß Str.

lactis das „gewöhnliche" Milchsäurebakterium genannt wird, ist also nicht auf eine große Verbreitung in der Natur zurückzuführen, sondern auf sein äußerst schnelles Entwicklungsvermögen in der Milch, wodurch es sich leicht zu erkennen gibt. Wie groß die Wachstumsgeschwindigkeit sein kann, geht daraus hervor, daß sich ein Keim von Str. lactis, der vom Schwein isoliert war, nach 48 Std. bei Zimmertemperatur bis auf 168 Milliarden Keime in steriler Milch vermehrt hatte.

In einem spärlichen Vorkommen in der Natur und in einer äußerst großen Wachstumsgeschwindigkeit in Milch liegt vielleicht die große Bedeutung des Str. lactis; denn hiermit hat die Natur möglicherweise die für das Milch- und Meiereiwesen günstigsten Bedingungen geschaffen. Diese Bedingungen können es sein, die Str. lactis zu einem „Schutzbakterium" für die Milch und einem äußerst nützlichen Organismus für die Milchwirtschaft machen. Während einerseits die große Wachstumsgeschwindigkeit in Milch dem Str. lactis die Fähigkeit gibt, die Milchschädlinge zu unterdrücken, ist es andererseits seiner verhältnismäßig geringen Verbreitung in der Natur zuzuschreiben, daß die Milch nicht als Folge einer übermäßigen Infektion mit Str. lactis zu frühzeitig gesäuert wird, so daß Gelegenheit zu einer rechtzeitigen Verwertung der Milch im Meiereibetrieb gegeben ist.

Der Grad des Einflusses der Schweinezucht und der Schweinehaltung auf die Haltbarkeit und Qualität der Meiereiprodukte, in bakteriologischer Hinsicht war nicht zu bestimmen, ohne daß spezielle Versuche in dieser Richtung vorgenommen wurden. So viel ist jedoch annehmbar, daß der Einfluß auf Milch und Meiereiprodukte in bakteriologischer Hinsicht um so größer ist, je größer der Zugang an Milchsäurebakterien, je größer die Infektionsquelle ist und je näher sie an der Produktionsstätte liegt. Von diesem Standpunkt aus kann man u. E. auch die Schlußfolgerung aus den hier ausgeführten Versuchen ziehen, daß der Einfluß der Milchsäurebakterien aus den Schweineställen auf Milch und Meiereiprodukte um so größer sein muß, je größer die verfütterte Milchmenge, je umfangreicher die Schweinezucht und je enger diese mit der Milchproduktionsstätte verknüpft ist. Es ist vielleicht kein Zufall, daß Dänemark, welches über die verhältnismäßig größte Schweinezucht der ganzen Welt verfügt, betreffs Haltbarkeit, Gleichmäßigkeit und Güte der Meiereiprodukte, speziell der Butter an erster Stelle steht. Hier ist zu erwähnen, daß in Dänemark die Handelsmeiereien die schlechteste Butter und unregelmäßigste Qualität produzieren, wie vom dänischen Staat festgestellt ist. Die Lieferanten dieser Meiereien bekommen keine Magermilch zurück, so daß sie meistens keine Schweinezucht und damit Milchfütterung, jedenfalls keine in größerem Umfang betreiben können. Innerhalb Deutschlands soll Schleswig-Holstein das Gebiet sein, in welchem die beste Butter hergestellt wird; gleichzeitig soll auch in dem genannten Gebiet die Schweinezucht den verhältnismäßig größten Umfang haben.

Im Jahre 1933 wurde vom Verf. eine Studienreise durch Dänemark unternommen, auf welcher eine große Anzahl Meiereien besucht wurde. In mehreren von diesen konnten die Journale die Aufschluß über die Qualitätsbeurteilung der Milch für die Lieferanten geben, durchgesehen werden. Hierbei ließ sich feststellen, daß die dänischen Lieferanten hinsichtlich der Reduktaseprobe um eine Stufe niedriger standen als die schwedischen Lieferanten. In der Erkenntnis, daß unter den Bakterien vor allem die Milchsäurebakterien und unter

diesen wiederum in erster Linie Str. lactis den größten Einfluß auf die Reduktaseprobe ausübt, kam Verf. auf den Gedanken, durch einen Vergleich der Reduktaseergebnisse in Schweden mit denen in Dänemark möglicherweise ein Bild über Häufigkeit und Mengenverhältnisse im Vorkommen der Milchsäurebakterien in der Milch in Schweden und in Dänemark zu erhalten.

Verf. ist zur Kenntnis gekommen, daß man in Dänemark Butterungsversuche (nicht offiziell) gemacht hat, mit Rahm, der von ausgeschlossener Milch der vierten Reduktaseklasse stammte, also der als schlechteste angesehenen Milchklasse nach dem von Barthel und Orla-Jensen (Abfärbungszeit innerhalb 20 Min.) ausgearbeiteten Beurteilungssystem (Barthel [3]). Aber man habe eine erstklassige Butter mit bester Haltbarkeit bekommen. Das Resultat ist leicht erklärlich. Wenn sich in der Milch, aus der die Butter hergestellt wurde, reichlich Milchsäurebakterien entwickelt hatten, bevor sie in die Meierei geliefert wurde, ist wohl anzunehmen, daß sie ebensogut als Produktionsmilch zu verwenden war wie eine Milch, die vielleicht keine oder nur langsam wachsende Milchsäurebakterien enthielt und eine bessere Reduktaseprobe ergab. Die Milch war im ersten Falle für die Butterbereitung sogar besser geeignet als die Milch im letztgenannten Falle.

In manchen Meiereien tritt zuweilen eine Degeneration des Säureweckers ein. Es gibt Meiereien, die jeden Monat einen Säurewecker kaufen, ohne jemals einen passenden zu erhalten, so daß die Produktion nicht gleichmäßig und auch nicht von bester Qualität bleibt. Für solche Meiereien wäre es vielleicht zweckmäßig, wenn sie sich einen passenden Säurewecker aus Milchsäurebakterien der eigenen Lieferantenmilch herstellten. Es ist nicht sicher, daß Milchsäurebakterien in dem Handelssäurewecker, der oft von weither, manchmal aus anderen Ländern bezogen wird, gerade für die Milch geeignet sind, für die er gebraucht werden soll. Wenn Milchsäurebakterien im Handelssäurewecker in einer ganz anderen Gegend und unter ganz fremden Verhältnissen verwendet werden, ist es vielleicht kein Wunder, daß er manchmal schnell entartet.

2. Ergebnisse und Zusammenfassung.

Durch die hier vorgenommenen Untersuchungen konnte folgendes festgestellt werden:

Im Darm von Schweinen, die mit Milch gefüttert waren, kamen reichlich Milchsäurebakterien vor; Ställe, in denen die Schweine mit Milch und Molke gefüttert wurden, stellten richtige Zentren für Milchsäurebakterien dar. Diese Tatsachen sprechen dafür, daß Str. lactis, das gewöhnliche Milchsäurebakterium, von hier aus verbreitet wird. Sie deuten auch schon darauf hin, daß die Schweinezucht unter gewissen Bedingungen einen günstigen Einfluß auf die Milch als Rekrutierungsort für die Milchsäurebakterien ausübt. Es ergab sich weiter, daß eine Identität des gewöhnlichen Milchsäurebakteriums Str. lactis mit dem gewöhnlichen Darmstreptococcus, Str. faecium oder eine Umwandlung der einen in die andere Art nicht nachgewiesen werden konnte. Alles deutet darauf hin, daß Str. lactis wenig in der Natur verbreitet ist und sich nur durch sein außerordentlich schnelles Entwicklungsvermögen in der Milch bemerkbar macht. Gewisse Umstände sprechen dafür, daß die Güte der Milch durch Str. lactis beeinflußt wird.

Literatur-Nachweis.

Barthel, Chr. (1), Lantbr. Akad. Handl. o. Tidskr. Bd. 44. 1905. S. 403. — Barthel, Chr. (2), Svenska Jordbukets Bok (Om Mjolk och Mjolkhushållning). Stockholm 1927. S. 388. — Barthel, Chr. (3), Untersuchungen von Milch und Molkereiprodukten. Berlin 1928. — Baumann, J., Untersuchungen uber die milchwirtschaftlich wichtigen Bakterien in den Faeces des Rindes. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1934. S. 170, 171.) — Burri, R., Zur Isolierung der Anaeroben. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902.) — Demeter, K. (1), Studien über die Milchsäure-Streptokokken. (Milchwirtsch. Forsch. Bd. 8. 1929. S. 202, 218, 244, 264, 266.) — Demeter, K. (2), Studien über Milchsaure-Streptokokken. [Über die Konstanz der Gärkraft von Fakalstreptokokken bei langjahriger Milchkultur.] (Milchwirtsch. Forsch. 1935. S. 44—50.) — Esten, M. H., Storrs Agr. Exp. Stat. Connecticut. Bull. 1911. p. 59 [nach Barthel (2)]. — von Freudenreich, E., Revue Gén. du Lait. 1901/02. p. 294 [nach Barthel (2)]. — Glet, P., Über die Einwirkung von roher dauer- u. hochpasteurisierter Milch auf den tierischen Organismus. (Milchwirtsch. Forsch. Bd. 8. 1929. S. 351.) — Gram, H. M., Den medicinshe mikrobiologi og immunitetslaere. Kristiania 1915. — Grotenfeldt, G., Fortschr. d. Med. 1889. — Gundel, M., Über die atiologische Bedeutung der „Enterokokken" bei Blasen-Nierenerkrankungen und über die Beziehungen der „Enterokokken" zu den Milchsauro-Streptokokken. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 99. 1926. S. 474.) — Heim, L., Milchsaure- und andere Streptokokken. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 101. 1924.) — Heinick, E., Arch. Tierheilkde. Bd. 29. 1903 (nach Mangold). — Henneberg, W., Beeinflussung der Darmflora. Hildesheim 1934. S. 10, 14. — Hoppfe, Über die Bakterienflora des Schweinedarms (nicht veröffentlicht, zitiert bei Mangold). — Hueppe, F., Mitteil. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 2. 1884. S. 309 (nach Scholl). — Hüttig, C. (1), Neue Anschauungen über die Entwicklungsmoglichkeiten bei Bakterien. (Molkerei-Zeitung Hildesheim. 1932. Nr. 76.) — Keitel, Fr., Hitzeresistente Milchsäure-Streptokokken, unter besonderer Berucksichtigung ihres Verhaltens in der Zuckerreihe und die Lackmus-Milchprobe. Diss. Kiel 1931. S. 17, 48, 49. — Leichmann, G., Milch-Ztg. Bd. 23 und 25. 1894 und 1896 [nach Barthel (2)]. — Lister, J., Transact. of the Pathol. Soc. of London. Vol. 29. 1878. p. 425 [nach Barthel (2)]. — Lindner, Mikroskopische Betriebskontrolle. 1930. S. 316. — Mack, Über Bacterium herbicola. Diss. Kiel 1936 (z. Z. noch unveröffentl.). — Mangold, E., Handbuch der Ernährung und des Stoffwechsels der Landwirtschaftlichen Nutztiere. Berlin 1929. S. 310, 311, 316, 336, 339. — Maurer, Die Darmbakterienflora gesunder erwachsener Menschen und ihre Beeinflussung durch den Genuß von Milch und Milcherzeugnissen. Beitr. zur Kenntnis der Darmsäurebakterien. Diss. Kiel 1929. — Meyer, K., Enterokokken als Artindividualitat. (Ztschr. f. Hyg. u. Inf. 1936. S. 210.) — Meyer, K. und Schönfeld, H., Über die Unterscheidung des Enterococcus viridans und die Beziehungen beider zum Streptococcus lactis. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 99. 1926. S. 402—416.) — Orla-Jenson, S., The lactic acid bacteria. (D. Kgl. Danske Vidensk. Shrifter. Kobenhavn 1919. Bd. 5.) — Orla-Jensen, S. und Winther, O., Forsog paa Omstemning ar Tarmfloraen hos Rotter og Mennesker. (Molkeritidende. Odense 1934.) — Pasteur, L., Ann. d. chim. et de physique. 1858 [nach Barthel (2)]. — Sach, Fr., Zur Kenntnis der in der Milch im Darm der Kühe und im Darm und anderen Organen der Menschen häufig vorkommenden Streptokokkenarten (z. T. „Enterokokken" der medizinischen Bakteriologen). Diss. Kiel 1935. — Sherman, J. M., and Kodge, H. M., Rate of growth and acid production of Streptococcus lactis. (Journ. of Dairy Science. Vol. 17. 1934. p. 497—500.) — Sherman, J. M., and Stark, P., The differentiation of Streptococcus lactis, from Streptococcus faecalis. (Journ. Dairy Science. Vol. 17. 1934. p. 525.) — Schieblich, S. 310 (Mangold). — Stahl, H., Für Milch wichtige Kuhkotbakterien und ihre Bekämpfung durch Milchsäuerung. Diss. München 1925. S. 12. — Stork, W., Über Umwandlungen von Milchsäurestreptokokken. Kiel 1936. — Svanberg, O., Über die Wachstumsgeschwindigkeit der Milchsäurebakterien bei verschiedener H-Konzentration. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 108. 1919/20. S. 210—243.) — Voß, A., Die Milchsäurebakterienflora im Darminhalt des Rindes und ihre Beeinflussung durch Rübenblätterfütterung. (Milchwirtsch. Forsch. Bd. 8. 1929. S. 386, 388, 390, 419.) — Weigmann, H., Die Pilzkunde der Milch. Berlin 1924. S. 62.

Nachdruck verboten.

Einfluß des Lichtes auf die Perithezienbildung von Venturia inaequalis Aderhold.

[Aus der Zweigstelle der Biologischen Reichsanstalt, Stade.]

Von **W. Holz.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die Bildung des Perithezienhalses von Venturia inaequalis erfolgt im Freien bekanntlich auf der dem Erdboden abgewandten Seite des Blattes. Diese Beobachtung an den überwinterten Blättern führte Wallace zu der Annahme, daß das Durchbrechen des Perithezienhalses negativ geotropisch bedingt sei. Wiesmann nahm an, daß die Askogonzellen sich an die der Perithezienöffnung entgegengesetzten Wandung anlegen, weil sie, dem Gesetz der Schwere folgend, niedersinken.

Während bei anderen Pilzen festgestellt wurde, daß die Bildung der Fruchtkörper durch das Licht beeinflußt wird, liegen bei Venturia inaequalis derartige Untersuchungen bisher nicht vor. Brefeld beobachtete z. B., daß sich die Fruchtkörper von Mucorineen dem Licht zuneigen. Die Hälse der Perithezien von Sordaria fimiseda wurden nach seinen Feststellungen nach der Lichtquelle hin gebildet. Bei Coprinus stercorarius ging die vegetative Entwicklung und die Bildung der Sclerotien sowohl im Dunkeln wie auch im Licht vor sich. Die normale Entwicklung der Fruktifikationsorgane aber stand in direkter Beziehung zum Licht. Diese Beobachtung konnte Schenk an Coprinus lagopus bestätigen. Gräntz fand, daß verschiedene Pilze im Dunkeln keinen Farbstoff in den Fruchtkörpern ausbilden. Nach den Beobachtungen von Ternetz ist für die Bildung der Apothezien von Ascophanus carneus unbedingt Licht erforderlich. In der Entwicklung weit vorgeschrittene Fruchtkörper starben sogar ab, wenn sie in das Dunkle überführt wurden. Die Untersuchungen von Stoll ergaben, daß die Fruchtkörperbildung von Ascophanus carneus im Dunkeln eine Verzögerung von 10—30 Tagen erfuhr, daß sie jedoch nicht vollkommen unterblieb. Die im Dunkeln gebildeten Fruchtkörper sind stets weiß. Mit steigender Lichtintensität nahmen die Apothezien die normale gelblich-rote Färbung an.

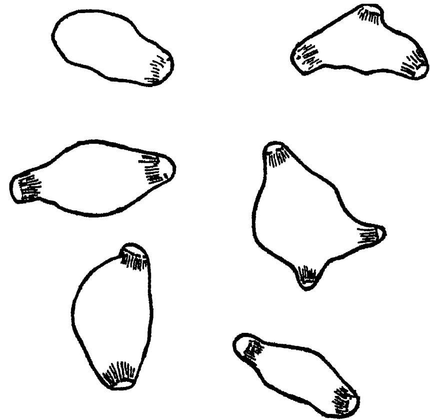


Abb. 1. Abnorme Perithezienformen in Bildung (300fache Vergr.).

Bei Venturia inaequalis konnten abnorme Fruchtkörper zum erstenmal im Frühjahr 1934 an Apfelblättern beobachtet werden. Die Blätter waren im Herbst in Blumentöpfe gepackt und zur Überwinterung

im Obsthof aufgestellt worden. Da die abnormen Perithezien niemals auf Blättern beobachtet wurden, die oben in den Töpfen lagen und sich auch auf Blättern zeigten, die in Dunkelkammern aufgestellt waren, lag die Vermutung nahe, daß das Licht eine Rolle bei ihrer Bildung spielt.

Anfang November wurden je 40 abgefallene Apfelblätter auf Brettern so aufgenagelt, daß bei einem Teil der Blätter die Oberseite und bei dem andern die Unterseite dem Brett auflagen. Die Überwinterung der Blätter erfolgte im Freien. Bei der Untersuchung am 12. März, zu der die Blätter vorher mit Kalilauge aufgehellt waren, zeigte sich, daß die Perithezienhälse zum Licht hin gebildet waren, ganz gleich, ob die Blattoberseite oder die Blattunterseite dem Licht zugewendet war. Durch diesen Versuch war zwar bewiesen, daß die Perithezienhälse sowohl zur Blattober- wie zur



Abb. 2.



Abb. 3.

Abb. 2. Perithezium bei der Bildung eines zweiten Halses nach unten (etwa 160fache Vergr.).
Abb. 3. U-förmiges Perithezium (etwa 160fache Vergr.).

Blattunterseite hin gebildet werden können, es war aber nicht ausgeschlossen, daß dies durch andere Faktoren bedingt war, die die Richtung der Perithezienbildung bestimmen. Infolgedessen mußten zum Beweis, daß das Licht der auslösende Faktor ist, weitere Versuche angestellt werden. Ebenfalls Anfang November wurden je 40 abgefallene Blätter 1. in Holzkästchen gepackt und mit 3 cm Erde überschichtet; 2. unter Dunkelstürze gebracht, von denen einer täglich und ein anderer wöchentlich 20 Min. zur Lichtzufuhr abgenommen wurde. Bei der Untersuchung am 10. März hatten die Mehrzahl der Blätter, die unter der Erde gelegen hatten, die Perithezien anormal ausgebildet. In den Blättern, die wöchentlich einmal belichtet waren, waren nur vereinzelte abnorme Perithezien zu finden. In vielen Fällen wurde durch die geringe Beleuchtung nur eine anormal starke Borstenbildung ausgelöst. Beim 1. Versuch war die Form der Perithezien viel mannigfaltiger. Die täglich 20 Min. belichteten Blätter hatten normale Fruchtkörper ausgebildet, deren Hälse zum Licht hin gerichtet waren. Demnach sind für das normale Ablaufen der Perithezienbildung nur geringe Lichtmengen erforderlich. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Brefeld, Schenk und Stoll an anderen Pilzen überein.

Die Formenmannigfaltigkeit der Perithezien von Venturia inaequalis zeigte sich bei einem weiteren Versuch. Apfelblätter wurden in einer Dunkelkammer bei 6,5° C von Anfang November an dauernd feucht gehalten. Anfang Januar waren die Anlagen der Perithezien erst als kugelige Gebilde zu sehen. Bei der nächsten Untersuchung am 21. Januar fiel auf. daß einige Perithezien Ausstülpungen nach verschiedenen Richtungen hin gebildet hatten (Abb. 1). Bei der folgenden Untersuchung am 18. Februar waren die Perithezien bereits reif. Die verschiedenen Perithezienformen sind in den Abbildungen 2, 3 und 4 dargestellt. Bei manchen Perithezien sind also mehrere Perithezienhälse gebildet worden. Manche haben solche sogar nach der Ober- und Unterseite hin entwickelt. Sämtliche Ausführgänge entließen keimfähige Askosporen.



Abb. 4.



Abb. 5.

Abb. 4. Perithezium mit 3 Ausfuhrgangen (etwa 160fache Vergr.)
Abb. 5. Normales, reifes Perithezium (etwa 160fache Vergr.).

Literaturverzeichnis.

Brefeld, O., Die Bedeutung des Lichtes fur die Entwicklung der Pilze. (Bot. Ztg. Bd. 35. 1877.) — Grantz, E., Über den Einfluß des Lichtes auf die Entwicklung einiger Pilze. Diss. Leipzig 1898. — Kuster, E., Kultur der Mikroorganismen. Leipzig u. Berlin (Verlag Teubner) 1921. — Schenk, E., Die Fruchtkorperbildung einiger Bolbitius- und Coprinus-Arten. (Beihefte z. Bot. Zentralbl. Bd. 36. 1919. S. 355—413.) — Stoll, K., Untersuchungen über die koprophilen Pilze unserer Haustiere. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 97—127.) — Stoll, K., Über den Einfluß des Lichtes auf die Apothezienbildung von Askophanus carneus Pers. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 93. 1936. S. 296—298.) — Ternetz, Ch., Protoplasmabewegungen und Fruchtkörperbildung bei Askophanus carneus. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 35. 1900. S. 273—312.) — Wallace, E., Scab disease of apple. (Corn. Univ. Agric. Exp. Stat. Bull. 335. 1913. p. 545—624.) — Wiesmann, R., Untersuchungen über die Überwinterung des Apfelschorfpilzes im toten Blatt, sowie die Ausbreitung der Sommersporen des Apfelschorfpilzes. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. Bd. 46. 1932. S. 619—679.)

Nachdruck verboten.

The Microbiology of Ensilage Production[1].

[Biochemical Institute (Helsinki).]

By **Artturi I. Virtanen.**

With 4 figures in the text.

Ensilage production has, for various reasons, become a most important part of modern dairy farming. In the first place, silage-making is independent of weather conditions. Secondly, it is possible to make into silage such forage crops as cannot be successfully dried in the field. Thirdly, silage production makes it possible to meet the protein requirements of the dairy stock, provided that the cultivation of forage crops has been arranged correspondingly — and fourthly, the preparation of good silage enables the farmer to produce summer milk of high vitamin potency throughout the year.

For the farmer, the production of silage is a purely practical problem. He has to know, how the crops should be treated in order to guarantee a successful preservation with the minimum loss of nutritive value. The literature on the subject is very confusing and contradictory, containing favourable reports of experiments with all the different methods. This is mainly due to the fact that a silage experiment may sometimes succeed comparatively well even with a method which is generally known to give poor results. Conflicting results with a given method are easily understood by studying the variety of processes which take place in the silage, and the course of which depends on several different factors. Another reason is that the estimation of the value of silage is often done on very different grounds. What is deemed good silage by certain experts might, on critical examination, prove a poor product indeed.

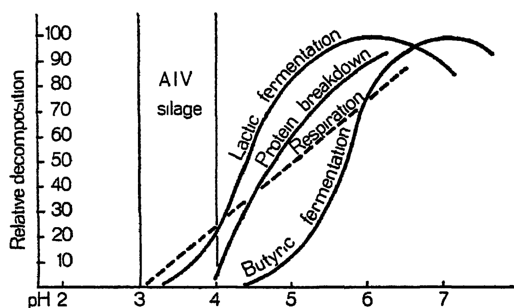


Fig. 1.

In my opinion, the silage problem has reached a completely new stage during the recent years and has at last received a scientific foundation. This again has resulted in a thorough change both in the practical preparation of silage and in the estimation of its value. Exports in different countries have gradually accepted the principle of the A. I. V. process that the prevention of harmful breakdown processes in silage is entirely dependent on the hydrogen ion concentration of the product and that these breakdown processes are practically inhibited below pH 4. It has been shown that the proteoclastic enzymes of green plants become inactivated below pH 4, at least so that no decomposition of amino acids takes place below this pH-

[1]) Presented before the Second International Congress for Microbiology. London (July 29) 1936.

value. This fact is of the greatest importance in silage production. The respiration of plant cells is likewise greatly suppressed by rising acidity, being already very slight at pH 4 and ceasing altogether at about pH 3. In addition, increasing hydrogen ion concentration has a profound effect on the life activities of those bacteria which cause the most harmful processes in the silage — especially members of the coli-aerogenes group, the gelatine-liquefying bacteria and the butyric acid bacilli. The activity of these organisms is arrested already between pH 4 and 5. On the other hand, the lactic flora of the silage is not yet destroyed at, or slightly below, pH 4. These facts are graphically illustrated by fig. 1.

The above theoretical conclusions regarding the effect of the hydrogen ion concentration of the silage on the action of micro-organisms and enzymes naturally also give a firm basis for practical work on silage preservation.

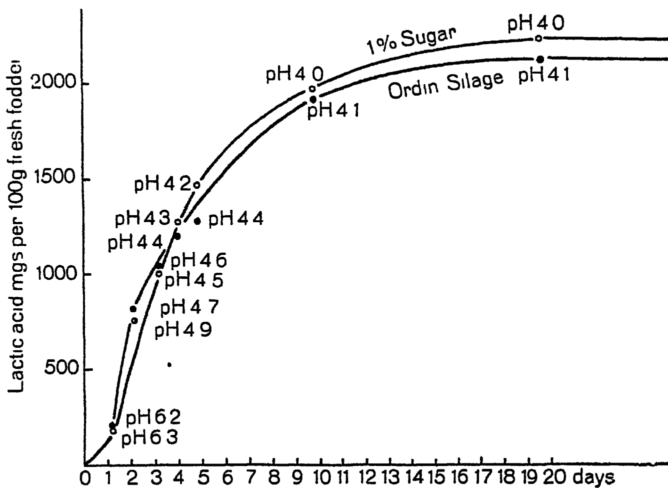


Fig. 2. Preservation of red clover in large glass cylinders (laboratory experiment).

We might conceive that the decisive value of pH 4 in the silage could be reached in two different ways: either biologically, in which case the lactic flora of the silage would produce sufficient lactic acid to raise the acidity of the mass to this value, or chemically, by an artificial acidification of the fresh crop to below pH 4.

An examination of the biological method — which has been employed empirically since ancient times in the preparation of ordinary silage — shows that this method is anything but foolproof. The fresh crop always contains large quantities of coli-aerogenes bacteria and gelatine-liquefying organisms which cause great losses in the material before the lactic acid bacteria become dominant. It is true that in tightly packed silage a powerful lactic fermentation takes place already after the first day, and continues at a high rate for several days, so that in favourable cases the hydrogen ion concentration can reach pH 4 as shown by fig. 2.

It is obvious, however, that very large quantities of lactic acid are required to bring the acidity of the fodder to below the critical value of pH 4. Thus, our investigations showed that fresh clover crops must contain

2 per cent of lactic acid in order to make their pH-value sink below pH 4. In high-protein crops the bacteria very seldom produce sufficient lactic and acetic acids to give the product a pH-value below 4. This is partly due to the fact that the sugar content of such crops is not sufficient for the formation of the requisite acidity. Another, and a more important reason is, however, the activity of the harmful bacteria during the early stages. These bacteria decompose proteins and split off carboxyl groups, forming ammonia and other basic substances which prevent the rise of the hydrogen ion concentration. In fact, it very often happens in high-protein material, that the pH of the product does not sink much below pH 5 so that the harmful processes are not prevented. In such cases, even the lactic acid is slowly decomposed, usually through the action of microörganisms belonging to the group of the butyric acid bacilli. This again naturally arrests the rise of the acidity and often causes it to fall. The following figure illustrates

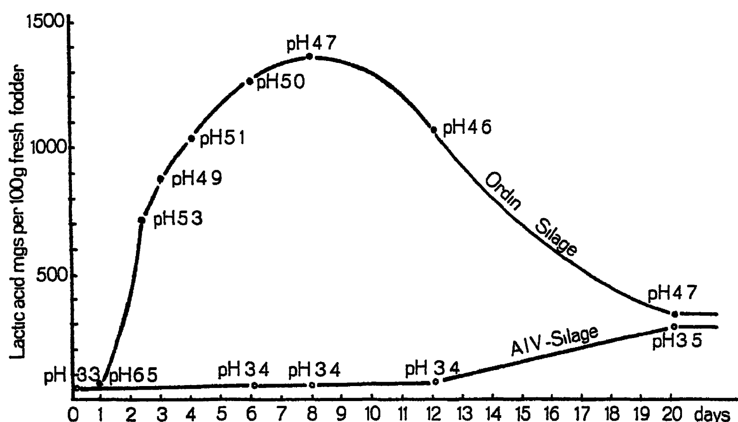


Fig. 3. Preservation of red clover in large glass cylinders (laboratory experiment).

one of our experiments with red clover (Fig. 3). The lactic acid content of the material shows a considerable decrease during the last two weeks.

The idea of promoting the lactic fermentation in the silage through the addition of sugar, — as suggested already by Völz in his cold fermentation method for high-protein crops — seems very natural in view of the above-mentioned facts. It must be remembered, however, that the harmful micro-organisms cause a considerable breakdown of proteins and also undesirable fermentations already during the first days of storage, before sufficient lactic acid has been formed. This fact renders even the sugar-addition-method rather uncertain in the preparation of silage especially as the added sugar is mostly fermented into alcohol and carbon dixide. In our laboratory experiments we added 1% of sugar to fresh red clover material and often failed to note any significant differences in the pH-values of the treated samples as compared with the untreated controls. In other cases again, the addition of sugar did clearly promote the rise of the acidity and the quality of the product was then naturally much improved. Even in such cases, however, it is not possible to avoid the decompositions which occur in the material during the first days.

On the basis of our own work, I feel strongly that in the preservation of different kinds of forage in practice, under very dissimilar conditions, it is impossible to guarantee that the pH of the material would, through lactic fermentation, sink below pH 4. If the pH of the fodder remains above 4, the material does not satisfy a critical examiner, as it has lost a considerable part of its nutritive value and often contains bad-smelling breakdown products which so easily give a taint to the milk. In this connection it is interesting to note that tryptophane seems to be most easily destroyed in silage. It is also known that the coli-bacteria form indole from tryptophane. We have analysed numerous samples of biologically prepared silage, and generally we found in them either no tryptophane at all or only insignificant traces.

For the above reasons. I feel that the artificial acidification of the fresh forage with the requisite quantity of acid is the only reliable method for preserving high-protein crops. During the years 1925—1928 we developed such a method, which is now known as the A.I.V.-process. Its chief feature is the acidification of the fresh material with strong mineral acids to between pH 4 and pH 3, where by harmful micro-organisms are destroyed and the formation of ammonia and the respiration of plant-cells are prevented (see Fig. 1).

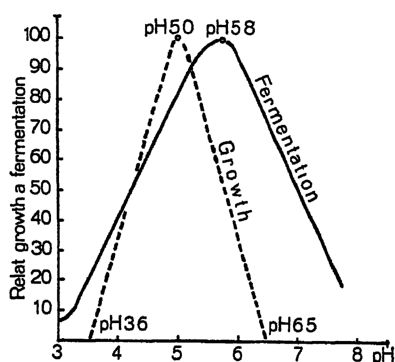


Fig. 4. pH-curves of the growth and fermentative action of Lactobacillus pentoaceticus.

The A.I.V.-method does not, however, involve a sterilisation of the forage. This can only be accomplished by using very large quantities of acid, when the silage becomes unfit for feeding. A pH-range of pH 4—3 does not yet require the presence of free mineral acids. If sufficient hydrochloric or sulphuric acid is added to the fresh material to bring the acidity of the mass, after completed reaction of the plant juices with the acid, to, for instance, pH 3.6, free mineral acid disappears rapidly, combining with the cations present. This results in the liberation of organic compounds of acid nature which than cause the acidity of the mass. Since neutral salts of mineral acids have no buffering action, the rise of the hydrogen ion concentration is not retarded.

The acitivity of lactic acid bacteria is not completely prevented in A.I.V.-silage, since particularly Lactobacillus pentoaceticus is active still below pH 4 as shown by Fig. 4.

Lactic acid is therefore regularly formed, though slowly, in A.I.V.-silage. In laboratory trials the formation of lactic acid in this silage generally begins only after a couple af weeks, provided that the initial acidity of the silage is below 4, for instance 3.5 (see Fig. 3). At the same time, some acetic acid is also formed, evidently from pentoses, which are fermented by Lactobacillus pentoaceticus with the formation of lactic and acetic acids in the ratio of 6 : 4. A.I.V.-silage generally contains less acetic acid than would correspond to this ratio, since lactic acid is formed also from hexoses. The pH of the silage is, however, hardly affected by the formation

of these weak acids. The acidity of A.I.V.-silage therefore remains fairly constant, in spite of the formation of lactic and acetic acids. — A clear proof of the insignificance of fermentations in A.I.V.-silage is that such silage regularly contains reducing sugar, which is generally not the case in ordinary silage.

Analyses of the microflora in samples of A.I.V.-silage show that the chief organism present is a long rod (Lactobacillus), which forms lactic acid both from hexoses and from pentoses. There are also regularly found bacteria of the genus Betacoccus, which likewise ferment pentoses. Furthermore, spores of Subtilis, Mesentericus and Amylobacter are generally present. Yeasts are also found in the A.I.V.-silage, and are evidently responsible for the small quantity of ethyl alcohol (generally about 0.3%) found in this material.

The butyric acid organisms, which cause great trouble in cheese industry, survive in A.I.V.-silage in the spore form, although in ordinary nutrient media they are destroyed if the acidity of the medium is maintained at pH 3.5 for a longer period of time.

The critical pH-values for the spores of butyric acid bacilli and for the lactic acid bacteria lie within the pH-range of the A.I.V.-method (pH 4—3) and it might therefore be expected that a silage with a pH of, say, 3.3 would be microbiologically very different from a silage of pH 3.8. This is, however, not the case in practice. Our extensive analytical material shows that lactic acid is found in A.I.V.-silage even with pH 3.3. Spores of butyric acid bacilli may also be found in A.I.V.-silage of such acidity. This is apparently ascribable to the fact that the silage mass is a heterogeneous system, containing also soil particles, etc. On the other hand the number of micro-organisms varies considerably depending upon the pH-value in the fodder. If pH is under 3 then the quantity of lactic acid bacteria is negligible.

Table 1.
Breakdown of protein in clover-aftermath during 4 months.

	Fresh crop	Hydrochloric acid added			No acid added
		Initial pH = 3.7 Final pH = 3.6	Initial pH = 4.1 Final pH = 4.3	Initial pH = 4.5 Final pH = 4.6	Final pH = 4.5
Soluble nitrogen as % of total nitrogen . .	26	28	44	60	65
Ammonia nitrogen as % of total nitrogen . .	1.5	2	12	21	22

As was mentioned, pH 4 is the critical value of acidity in silage. Should the pH of the material be even slightly above 4, the detrimental processes, above all the formation of ammonia, will not be arrested (Table 1). The formation of ammonia is, in fact, the best criterion for the quality of silage, so that it is possible to obtain a fairly accurate estimate of any silage by determining its ammonia content (total N basis). When the silage has been made by a fermentation process, the determination of ammonia should always be made, even though the pH of the material might be below 4. During the early stages, various decom-

position processes have necessarily taken place, and their extent is best illustrated by the ammonia content of the finished product. On the other hand, if the silage has been preserved by artificial acidification, its pH-value alone will be a sufficient criterion for its quality, as it will already make possible an estimation of the ammonia formation as well as of other microbiological changes. In A.I.V.-silage of pH 3.5—3.8, the formation of ammonia is almost negligible, only about 1—3% of the total N (after subtraction of the corresponding value for the fresh crop). Even this spurious amount of ammonia is derived from amides. On the other hand, in ordinary silage with its much higher ammonia content, only a smaller part of the ammonia originates from amides, the major part being derived from amino acids through a cleavage of the amino group (Table 2). It is important to

Table 2.

Clover aftermath, preserved in large circular glass containers for 40 days.

Method of ensilage	pH	Dry matter %	Total N, % of the dry matter	True protein-N, % of total N	NH_3-N, % of total N
Fresh crop	6.60	18.0	3.78	88.6	0.8
A.I.V.-silage	3.60	17.84	3.70	73.0	1.9
Ordinary silage	4.99	14.98	4.18	50.7	14.1
Sugar silage (0.7% sugar)	5.02	14.98	4.0	48.7	15.2
Salt silage (1% NaCl) .	5.11	15.43	4.0	50.4	16.7

Method of ensilage	Amino-N, split off as NH_3, % of total N	Total hydrolysable sugar, % of the dry matter	Reducing sugar, % of the dry matter	CO_2 formed per 1 kg dry matter, g
Fresh crop	0	21.1	1.8	—
A.I.V.-silage	—	12.2	1.1	24.50
Ordinary silage	11.3	9.3	0	94.78
Sugar silage (0.7% sugar)	11.7	8.3	traces	139.90
Salt silage (1% NaCl) .	13.5	8.6	0	105.28

know the origin of ammonia, as the value of the silage protein is essentially dependent on whether the amino acids are well preserved. The fact that in the formation of ammonia certain important amino acids are chiefly concerned, while others are less seriously affected, should be duly considered in determining the physiological value of silage.

Nachdruck verboten.

Einige Bemerkungen zu dem von A. J. Kluyver und C. B. van Niel vorgeschlagenen natürlichen Bakteriensystem[1]).

Von S. **Orla-Jensen**, Kopenhagen.

Die letzten 30 Jahre haben uns gelehrt, daß die Gärungsprozesse noch viel verwickelter sind, als man je gedacht hat, und — trotz der Errungenschaften hervorragender Biochemiker — fehlt uns noch der einheitliche Überblick über sämtliche Gärungserscheinungen. Deshalb ist es auch noch nicht möglich, die Hauptlinien des Bakteriensystems endgültig aufzuziehen. Dies macht es aber nicht weniger verdienstvoll zu versuchen, wie weit man in dieser Beziehung kommen kann, und wenn zwei so hervorragende Forscher wie Kluyver und van Niel den Versuch wagen, lohnt es sich wohl für andere Bakteriologen die Ergebnisse zu erörtern, um eventuell über etwas einig zu werden. Es sollte wenigstens möglich sein, sich über gewisse Regeln der Nomenklatur zu verständigen, und dies hat am Ende größere praktische Bedeutung als die Systematik, für welche die Zeit vielleicht noch nicht reif ist.

Wie Kluyver und van Niel möchte auch ich mit den Prinzipien der Bakteriensystematik anfangen und referieren, was ich früher darüber geschrieben habe. Zu einer Zeit (1907), da alle Bakteriensysteme rein morphologisch waren, versuchte ich „Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems“[2]) aufzuzeigen, dabei die Bedeutung der physiologischen Merkmale hervorhebend. Dies geschah um so mehr, weil die Bakterien in dieser Beziehung weit größere Unterschiede aufweisen als in morphologischer. Nach Erläuterung der Gärungsprozesse mit ihren Wärmetönungen, soweit sie damals bekannt waren, untersuchte ich, welche der morphologischen Eigenschaften sich mit den physiologischen in Einklang bringen ließen, und ich fand, daß es absolut nicht das bisher benutzte Hauptmerkmal, die Form der Zellen war, sondern die Art und Weise, in welcher die Zellen begeißelt sind. Ich schrieb folgendes:

„Bei der Aufstellung dieses Systems haben wir bisher die morphologischen Eigenschaften der Bakterien nicht berücksichtigt, weil diese, wie ich eingangs betonte, erst in zweiter Linie in Betracht kommen. Eine Einteilung lediglich auf Grund einiger mehr oder weniger zufällig gewählten außerlichen Ähnlichkeiten gehört nicht in die wahre Naturwissenschaft, denn hier muß die Natur selber den Weg zeigen. Und diese zeigt denn auch, wie es zu erwarten war, daß die ersten Bakterien[3]) die einfach möglichste Form besaßen; sie waren namlich Kurzstäbchen und — insofern es gelungen ist, ihre Geißeln zu beobachten — monotrich. Sie waren nicht sporenbildend oder verzweigt. Die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen oder Verzweigungen gehört daher höheren Entwicklungsstufen an.

Da die lophotrichen Bakterien sich eigentlich nur dadurch von den monotrichen unterscheiden, daß sie mit polaren Zilien reichlicher ausgestattet sind, so existieren keine scharfen Grenzen zwischen diesen zwei Formen, sondern es gehören zu derselben Familie — ja möglicherweise auch zu derselben Gattung — sowohl monotriche als lophotriche Arten. Die peritrichen Bakterien bilden dagegen, wie wir später sehen werden, wegen ihrer ausgesprochenen Fähigkeit zur Spaltung von Kohlenhydraten oder Aminosäuren ein abgeschlossenes Ganzes. Ich habe es deshalb natürlich gefunden,

[1]) Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 94. S. 369—403.

[2]) Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1909. S. 305—346. Diese Arbeit ist als Broschüre bei Gustav Fischer, Jena, noch erhältlich.

[3]) Es ist in der Arbeit näher begründet, welche der autotrophen Bakterien wahrscheinlich die ältesten sind.

das ganze Bakterienreich in die zwei Ordnungen Cephalotrichinae und Peritrichinae einzuteilen."

Auf dem fünften Botanikerkongreß in Cambridge 1930[1]) gab ich diesem Einteilungsprinzip folgenden Ausdruck:

„Most water-bacteria and bacteria which can be satisfied with simple nutriment matter and which usually produce their energy by oxydation processes are, if motile, cephalotrichous, where as bacteria requiring more complicated nutriment are, if mobile, peritrichous. To the first group belong undoubtedly the earliest organisms on earth. The cephalotrichous bacteria are always Gram-negative, whereas the peritrichous bacteria are mostly Gram-positive. The transition between the two groups is found by those peritrichous bacteria, which are Gram-negative."

Da man denitrifizierende Eigenschaften sowohl unter den fluoreszierenden Bakterien wie unter den Colibakterien antrifft, habe ich es ursprünglich natürlich gefunden den Übergang zwischen den zwei Hauptgruppen hier zu suchen. Mit ebensoviel Recht läßt sich dieser Übergang auch zwischen den fluoreszierenden Bakterien (wozu das einen blauen Farbstoff bildende Bact. pyocyaneum gehört) und der Gattung des Bact. violaceum suchen, weil man in letzterer Gattung sowohl cephalotriche wie peritriche Arten antrifft[2]), was durch Untersuchungen von G. Faulenborg im hiesigen Laboratorium bestätigt worden ist. Über die Phylogenie der Bakterien und andere Lebewesen muß ich übrigens auf meine früheren Arbeiten verweisen. Nur möchte ich erwähnen, daß ich selbstverständlich die Krankheitsbakterien des Menschen zu den spätest entstandenen Mikroorganismen rechne, die deshalb als die äußersten Zweige auf dem großen Stammbaum der Bakterien, nur wenig systematisches Interesse besitzen. Ich habe das gleiche später in einer anderen Abhandlung folgendermaßen ausgedrückt[3]):

The interest which has been awakened in the pathogenic bacteria described in medical literature has hitherto left its trace in bacteriology to such an extent that it has been attempted to group all known bacteria around these. The pathogenic bacteria are, fortunately, in the minority; the bulk of bacteria are leading a saprophytic existence and like plants have their natural habitants in the soil. We therefore first have to put in order the saprophytes; then we can begin to meditate about where we have to place the parasites.

In vielem des hier Zitierten sind Kluyver und van Niel mit mir ganz einverstanden, und ich brauche deshalb nur auf die Punkte näher einzugehen, wo unsere Ansichten auseinandergehen.

Obwohl Kluyver und van Niel das Einteilungsprinzip nach Anordnung der Geißeln keineswegs unterschätzen, haben sie sich von der altmodischen Haupteinteilung der Bakterien nach Form der Zelle nicht trennen können, und bevor dies endgültig geschieht, ist es unmöglich, ein natürliches Bakteriensystem aufzustellen. Die Form der Zellen kann höchstens als Gattungsmerkmal, aber nicht als Familienmerkmal benutzt werden, denn in den meisten Familien kommen nicht nur sowohl Kugel- als Stäbchenformen, sondern bisweilen auch andere Formen vor. Bezüglich der verschiedenen Familien der Schwefelbakterien ist dies schon längst bekannt, und zu den Milchsäurebakterien gehören Langstäbchen und Kurzstäbchen wie auch Kugelformen, die sich meistens nur nach einer Richtung,

---

[1]) Fifth International Botanical Congress. Cambridge 1930. Report of Proceedings.

[2]) Cruess-Callaghan and Gorman, M. J., The Scientific Proceedings of The Royal Dublin Society. Vol. 21. 1935. p. 213—222.

[3]) The Journal of Bacteriology. Vol. 6. 1921. p. 263—273.

seltener nach zwei Richtungen teilen. Die Milchsäurestreptokokken sind mit den Milchsäurekurzstäbchen, den Streptobakterien, viel enger verwandt als mit den meisten Mikrokokken und Sarzinen. Dies zeigt sich in den Nahrungsansprüchen wie im Aussehen. Auf festem Nahrungssubstrat gezüchtet bilden die Streptokokken häufig Kurzstäbchen, und in Bouillon gezüchtet wachsen die Streptobakterien wie Streptokokken. Auch unter den Propionsäurebakterien, die meistens als mehr oder weniger verzweigte Stäbchen auftreten, kommen kugelförmige Arten vor, die in der Milch von Sc. lactis nicht zu unterscheiden sind. Es gibt deshalb ein überaus unnatürliches System, sämtliche kugelförmigen Bakterien, einerlei ob sie Schwefelbakterien, Milchsäurebakterien, aerobe Mikrokokken oder anaerobe Sarcinen sind, in eine Familie, die Coccaceae zu vereinigen. Ebenso unnatürlich ist es, sämtliche stäbchenförmigen Bakterien, welche verschiedene physiologische Eigenschaften besitzen können, in einer anderen Familie, den Bacteriaceae, zu vereinigen. Den Vorteil besitzt jedoch das System von Kluyver und van Niel, nämlich, daß die cephalotrichen Bakterien ausgeschieden, und in einer besonderen Familie, den Pseudomonadaceae, gesammelt sind.

Kluyver und van Niel halten die Kugelform für die einfachst mögliche Form, und mit ihrer morphologischen Einstellung nehmen sie deshalb an, daß die ältesten Bakterien Kokken gewesen seien. Für nackte Zellen ist es unbedingt richtig, daß die Tropfen- oder Kugelform die einfachste ist. Auch für die mit Membran versehenen Zellen scheint mir die Kugelform die natürlichste, insofern die Zellen, wie bei den Sarcinen, sich nach allen drei Richtungen teilen. Anders dagegen, wenn die Zellen sich nur nach einer Richtung teilen und sich deshalb auch nur nach einer Richtung strecken. Hier muß die Kugelform als ein Spezialfall der Stäbchenform betrachtet werden, nämlich der, wo ein Stäbchen (mit abgerundeten Enden) sich vor der Teilung nur wenig streckt. Umgekehrt entsteht die Fädenform, wenn das Stäbchen sich vor der Teilung ungemein stark streckt. Nach meinen Überlegungen deutet, wie erwähnt, alles darauf hin, daß die ältesten Bakterien cephalotriche Kurzstäbchen waren. Dieselben haben sich dann einerseits zu Spirillen und andererseits zu peritrichen Stäbchen, und darunter vielleicht auch solchen, die so kurz wie Kokken sind, entwickelt.

Wenn man einerseits weiß, welchen Formwechsel derselbe reingezüchtete Bakterienstamm unter verschiedenen Züchtungsbedingungen und in verschiedenen Stadien des Lebenskreislaufes aufweisen kann, und andererseits weiß, daß es noch nie gelungen ist, den Stoffwechsel eines Bakteriums in ganz neue Bahnen zu lenken, so ist es doch weit natürlicher sich zu denken, daß die mannigfaltigen höchst verschiedenen Bakterienarten durch eine morphologische Anpassung innerhalb der physiologischen Gruppen als durch eine physiologische Anpassung innerhalb der morphologischen Gruppen entstanden sind.

Kluyver und van Niel haben indessen die entgegengesetzte Auffassung und werfen mir vor, daß ich die unbeweglichen Bakterien, bei welchen also das morphologische Hauptmerkmal, die Anordnung der Geißeln, fehlt, lediglich nach ihren physiologischen Eigenschaften in das System placiert hätte. Selbstverständlich wird die Systematik immer unsicher, wenn man keine charakteristischen morphologischen Anhaltspunkte besitzt, und ich bin deshalb auf diesem Punkte bereit, Änderungsvorschläge zu meinem Bakteriensystem anzunehmen, wenn überzeugende Gründe dafür vorliegen.

In den diesbezüglichen Änderungsvorschlägen von Kluyver und van Niel liegen indessen keine solche vor. Sie nehmen z. B. an, daß die Corynebakterien und die Mykobakterien und damit auch die Aktinomyceten sich den Milchsäurebakterien und somit auch den peritrichen Bakterien anschließen, während ich sie, wegen ihres oxydativen Stoffwechsels, eher von den cephalotrichen Bakterien ableite, und sie als Übergangsformen zu den Schimmelpilzen betrachte. Der Umstand, daß die genannten Bakterien grampositiv sind, wirkt nicht überzeugend, weil die cephalotrichen Bakterien sich sehr gut aus verschiedenen Gattungen zu grampositiven Organismen haben entwickeln können, und keulenförmige wie verzweigte Zellen trifft man sowohl bei den cephalotrichen Bakterien (Rhizobium = Rhizomonas) wie bei den peritrichen Bakterien (Bacterium bifidum und den Propionsäurebakterien). Durch meine eigenen Untersuchungen habe ich indessen Organismen kennengelernt, die als Übergangsformen zwischen Milchsäurebakterien und Aktinomyceten (eventuell Coryne- oder Mykobakterien) betrachtet werden können. Im Pansen der Wiederkäuer sind sie häufig, und Rigmor v. Magnus hat sie fast immer im Schlund der Menschen nachweisen können[1]). Diese sehr unregelmäßigen Organismen bilden aus Zucker in geeigneten Nährsubstraten recht viel Milchsäure.

Wenn somit auch etwas dafür spricht, daß die genannten unbeweglichen, grampositiven, unregelmäßig geformten Bakterien den Milchsäurebakterien nahestehen, so spricht doch nichts dafür, die sehr regelmäßig geformten Strepto- und Betabakterien zu den Corynebakterien, und die nie verzweigten recht anaeroben Thermobakterien zu den Mykobakterien zu rechnen, wie Kluyver und van Niel dies tun. Bact. bifidum ist heterofermentativ und schließt sich deshalb eher den Betabakterien als den Thermobakterien an.

Während somit das natürliche Bakteriensystem von Kluyver und van Niel in der Haupteinteilung sehr weit von dem meinigen abweicht, stehen diese Systeme doch einander so nahe, daß sie bezüglich der Gattungen und der dazu gehörenden Arten nur wenig abweichen[2]). Da hier die Unübereinstimmungen auf Gebieten liegen, auf denen ich nicht Spezialist bin, muß ich eine eventuelle Kritik hierüber anderen überlassen.

Was endlich die von Kluyver und van Niel verwendete Nomenklatur betrifft, freut es mich, daß sie meistens mit der von mir vorgeschlagenen bakteriologischen Nomenklatur zusammenfällt. Nach meinem Vorschlag ist es in der Bakteriologie wie in der Chemie anzustreben, beschreibende Namen zu verwenden, damit die Namen eine Stütze für das Gedächtnis und nicht eine äußerliche Belastung desselben werden. Die Gattungsnamen sollen deshalb aus einer morphologischen Bezeichnung und einer die Gattung näher charakterisierten Vorsilbe bestehen. Als morphologische Bezeichnungen empfiehlt es sich, die schon jetzt in der Bakteriologie gewöhnlich benutzten zu verwenden, damit man sofort versteht, daß der betreffende Organismus ein Bakterium ist und nicht etwa ein Tier oder eine höhere Pflanze sei. Man verwendet deshalb für die Schraubenformen Vibrio und Spirillum,

---

[1]) Doktordisputats. Kopenhagen 1936.

[2]) In meinem System von 1909 habe ich das Gelatineverflussigungsvermögen der Bakterien als Gattungsmerkmal verwendet; ich habe jedoch später eingesehen, daß dies verfehlt ist, weshalb ich in meiner Abhandlung in Journal of Bacteriology, 1921, das Gelatineverflüssigungsvermögen nur als Artmerkmal verwendete. In Übereinstimmung hiermit ist Liquidomonas in Fluormonas umgetauft worden.

für die sporenfreien Stäbchen Monas[1]) oder Bacterium, je nachdem sie cephalotrich oder peritrich sind. Dieselben Bezeichnungen werden für die unbeweglichen sporenfreien Stäbchen benutzt, je nachdem sie den cephalotrichen oder den peritrichen Bakterien am nächsten stehen. Für die sporenbildenden Stäbchen[2]) verwendet man Bacillus oder Clostridium, je nachdem sie der aeroben Gruppe der Heu- und Kartoffelbazillen oder der anaeroben Gruppe der Buttersäurebakterien angehören, und für die Kugelformen verwendet man Coccus und Sarcina. Die Vorsilbe kann nach Belieben auf morphologische wie auf physiologische Eigenschaften hindeuten, und wünscht man die Verwandtschaft zwischen einer Gattung von Stäbchenformen mit einer Gattung von Schraubenformen oder von Kugelformen anzudeuten, gibt man einfach den Gattungen die gleiche Vorsilbe.

Die verhältnismäßig wenigen Abweichungen von diesen Regeln, welche das System von Kluyver und van Niel aufweist, sind leicht zu ändern. Besonders müssen die von Eigennamen (oft nicht einmal von Eigennamen der Entdecker der Bakterien) abgeleiteten, völlig nichtssagenden Namen wie Listerella, Neisseria, Veillonella, Gaffkya und Kurthia vermieden werden.

Kluyver und van Niel bezeichnen eine Reihe Fäulnisbakterien mit der Vorsilbe Pepto (Peptococcus, Peptostreptococcus und Peptoclostridium) was den Gedanken auf die erste Stufe des Eiweißabbaus lenkt, und dazu führt, daß man glaubt, daß der gelatineverflüssigende Streptococcus liquefaciens ein Peptostreptococcus sei. Da dies aber nicht gemeint ist, wäre es im vorliegenden Falle besser, wie ich es getan habe, die Vorsilbe Putri zu benutzen.

Selbstverständlich soll man für ein Bakterium so weit als möglich den zuerst gegebenen Namen weiter verwenden, jedoch ist ein solcher Name zu ändern, wenn er für eine rationelle Nomenklatur ein Hindernis bildet, so wie man es auch mit den biochemischen Namen tut (z. B. wenn man Invertin in Saccharase abändert). Dies ist in der Bakteriologie um so mehr berechtigt, weil die ältere Beschreibung vieler Bakterien so unvollständig ist, daß man nicht mehr entscheiden kann, um welche der jetzt bekannten Arten es sich eigentlich handelt. Die Bakteriologie ist noch eine junge Wissenschaft, und es ist zu hoffen, daß das vor wenigen Jahren gebildete Komitee für Bakteriennomenklatur der Internationalen Gesellschaft für Mikrobiologie, die Fehler, welche in der botanischen und zoologischen Nomenklatur begangen sind, vermeiden wird.

---

[1]) Eigentlich sollte, um eine Verwechslung mit den echten Monaden zu vermeiden, Pseudomonas verwendet werden, dies wird aber zu lang, wenn noch eine Vorsilbe dazu kommt.

[2]) Da die Sporenbildner die Fähigkeit zur Sporenbildung verlieren können, kann dies systematische Schwierigkeiten verursachen. Im Kase habe ich z. B. mehrmals gelatineverflüssigende, gramnegative, aerobe Plectridien (wahrscheinlich Plectridium novum. Huß) gefunden, die sehr schnell die Fähigkeit zur Sporenbildung verlieren und dann von Bacterium cloacae nicht mehr zu unterscheiden sind.

Referate.

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Kluyver, A. J., Bacterial metabolism. (Ann. Rev. of Biochem. Vol. 5. 1936. p. 539—569.)

In gedrängter Übersicht werden die neuesten Forschungsergebnisse des letzten Jahres auf dem Gebiete des Bakterienstoffwechsels besprochen. Autotrophe und heterotrophe, aerobe und anaerobe Bakterien sowie die verschiedenen Stoffwechselspezialisten des Bakterienreichs haben manchen Forscher zu wichtigen neuen Erkenntnissen geführt, die auch für andere Zweige der Biologie von Bedeutung sein werden.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Leonian, L. H., Effects of Auxins from Some Green Algae upon Phytophthora cactorum. (Bot. Gaz. Vol. 97. p. 854—859. 1936.)

Wenn Phytophthora cactorum auf folgende Nährlösung gebracht wird: 5g Dextrose, 1g KNO_3, 0,5g KH_2PO_4, 0,25 g $MgSO_4$, 20 g Agar auf 1 l dest. Wasser, so wächst dieser Pilz nicht mehr. Vier einzellige Algen: Chlorella viscosa, Coccomyxa simplex, Oocystis naegelii, Scenedesmus flavescens, gedeihen auf dem angeführten Medium mittelmäßig, bei Zugabe von alkoholischem Gartenerbsen-Extrakt jedoch üppig. Auf den Filtraten der extraktfreien Lösungen, auf denen Coccomyxa und Oocystis gezogen worden waren, konnte der Schadpilz gut vorankommen, auf den beiden anderen Filtraten nur schwach. Bringt man ein kräftiges, aber sterile Myzel auf solch ein Algenfiltrat, so wird die Bildung von Sporangien und Oogonien angeregt. Insbesondere erzeugt Oocystis selber einen ätherlöslichen Wuchsstoff, der die Bildung der Sexualorgane veranlaßt. Der Extrakt zeigte sich stärker wirksam als das Algenfiltrat. Verf. weist auf die Bedeutung hin, die Wuchsstoff-produzierende Algen und Pilze für die Bodenmikrobiologie, für höhere Pflanzen und für die Symbiose bei Flechten haben.

Skallau (Berlin).

Rippel, A. und Behr, G., Über den Energieumsatz bei Aspergillus niger unter dem Einfluß der Kaliumversorgung. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 315—322.)

Frühere Versuche (ref. diese Ztschr. Bd. 93, S. 214) hatten ein unökonomischeres Arbeiten von Aspergillus niger bei schlechter Versorgung mit Kalium ergeben gegenüber guter Versorgung damit. Da die Stoffwechselprodukte nicht quantitativ erfaßt werden können, war eine gesamte Energiebilanz notwendig, die durch kalorimetrische Bestimmung der Ausgangslösung, des Myzels und der Kulturflüssigkeit nach Abbruch des Versuches erzielt wurde. Verwendet wurde das Eucken-Meyersche Kalorimeter. Es ergab sich, daß tatsächlich bei Kalimangel der Pilz unökonomischer arbeitet. Doch müssen weitere Versuche zeigen, ob das nur bei Kalimangel der Fall ist oder auch bei Mangel an anderen Nährstoffen.

Rippel (Göttingen).

Steinberg, R. A., Some effects of the heavy metals essential for the nutrition of Aspergillus niger upon its growth. (Amer. Journ. of Bot. Vol. 23. 1936. p. 227—231.)

Es wird die Lebensnotwendigkeit des Eisens, Zinks, Kupfers und Mangans für Aspergillus niger nachgewiesen sowie der Einfluß dieser

Spurenelemente auf Wachstum, Sporulation und Reaktion der Nährlösung untersucht. Ein deutlicher Ionenantagonismus ist bei diesen Elementen noch bei äußerst starker Verdünnung zu erkennen. Ihre Optimalkonzentrationen liegen im alkalischen Bereich beträchtlich höher als im saueren bis neutralen und werden mit abfallendem p_H-Wert kleiner bei Verlängerung der Kulturdauer. Hier ergeben sich gewisse Widersprüche zu den Untersuchungsergebnissen von Rippel und Meyer über die Wachstumskurve des Pilzes, die hierbei eine nicht so weitgehend optimal zusammengesetzte Nährlösung benutzt haben. Bortels (Berlin-Dahlem).

Steinberg, R. A., Relation of accessory growth substances to heavy metals, including molybdenum, in the nutrition of Aspergillus niger. (Journ. of Agric. Res. Vol. 52. 1936. p. 439—448.)

Wie sich im Verlauf neuerer Untersuchungen des Verf.s herausgestellt hat, bedarf es in besonders gereinigten Nährlösungen nicht nur des Zusatzes von Salzen des Eisens, Zinks, Kupfers und Mangans, sondern auch des Molybdäns. Besonders wichtig ist die Entdeckung, daß bei der Reinigung des Zuckers mit Alkohol nicht nur die akzessorischen Nährstoffe „Bios“ und „Coenzym R“ entfernt werden, sondern auch Zink und Molybdän. Es ist also durchaus möglich, daß die Wirkung dieser vitaminartigen Stoffe auf ihrem Gehalt an solchen Schwermetallen beruht, was für Aspergillus niger jedenfalls zutrifft. Wenn Verf. meint, daß Molybdän nicht als Katalysator der Stickstoffbindung angesehen werden könne, weil es auch für Aspergillus lebensnotwendig ist, so kann Ref. dieser Anschauung insofern nicht beipflichten, als die von stickstoffbindenden Organismen benötigten Molybdänmengen wesentlich größer sind, und es auch noch nicht endgültig erwiesen ist, daß Aspergillus niger gar keinen Stickstoff bindet. Bortels (Berlin-Dahlem).

Bernhauer, K. und **Iglauer, A.**, Über die Säurebildung aus Zucker durch Aspergillus niger. 7. Mitteilung: Die Bedeutung der Stickstoffquelle für die Zitronensäurebildung. (Biochem. Ztschr. Bd. 287. 1936. S. 153—166.)

Bei den fortgesetzten Untersuchungen über die günstigsten Kulturbedingungen für die Zitronensäurebildung durch Aspergillus niger in Rohrzuckerlösungen wurde ermittelt, daß die günstigste Stickstoffkonzentration 0,07—0,0875 % beträgt. Von allen untersuchten Nitraten und Ammonsalzen hat sich Magnesiumnitrat als günstigste Stickstoffquelle erwiesen, mit der die maximale Zintronensäure-Ausbeute von 80% (bezogen auf Zucker) bzw. 90% nach Abzug des Myzelgewichtes in 17,5proz. und 20proz. Zuckerlösung in kürzester Zeit erreicht wurde, nämlich am 12. Tage. Schwankungen in der Höhe der Ausbeute bei offensichtlich konstanten Bedingungen beruhen nach Ansicht der Verff. auf dem Einfluß eines ungleichen Gehalts der verwendeten Zucker an gewissen Verunreinigungen. Sterilisation der Nährlösung wirkte sich auf die Zitronensäurebildung stets hemmend aus.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Walker, T. K., Entstehung von Citronensäure aus Glukose durch Aspergillus niger in Gegenwart von Jodessigsäure. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 786.)

Bei der Züchtung 6 verschiedener Arten von Asp. niger in 10proz. Glukoselösung unter Zugabe von M/100 Jodazetat unterblieb die Entstehung

von Äthylalkohol, während die Ausbeute an Zitronensäure nicht beeinflußt wurde. Deren Bildung aus Glukose durch Schimmelpilze ist also offenbar nicht auf eine einleitende alkoholische Gärung zurückzuführen.

Heuß (Berlin).

Challenger, F., Methylierung von As-, Se-haltigen Verbindungen durch P. brevicaule. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 786.)

Durch Penicillium brevicaule werden anorganische Verbindungen von As und Se in Trimethylarsin und Dimethylselenid umgewandelt.

Heuß (Berlin).

Chrzaszcz, T. v. und Leonhard, K., Entstehung von Citronensäure aus Milchsäure. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 786.)

Bei der Einwirkung von Botrytis Cinerea auf einen 2,5% Kalziumlaktat und 1% -karbonat enthaltenden Nährboden wurden 50,7% des Laktats umgesetzt, wovon 8,3 bzw. 15% in Zitronen- bzw. Oxalsäure umgewandelt wurden. Aus dem Rest entstanden 27,5% Kohlensäure und eine Reihe anderer Produkte.

Heuß (Berlin).

Bernhauer, K. und Thole, H., Über die Säurebildung durch Rhizopus-Arten. 1. Mitteilung: Die Bildung von Äpfelsäure bei der Fumarsäuregärung. (Biochem. Ztschr. Bd. 287. 1936. S. 167—171.)

Auf Grund der mitgeteilten Analysen scheint die Äpfelsäure durch Umwandlung der Fumarsäure zu entstehen. So werden auch die oft beobachteten großen Schwankungen in den Säureausbeuten verständlich. Denn Fumarsäure wird um so schneller in Äpfelsäure überführt werden, je mehr von dem schwerlöslichen Kalziumfumarat sich in Lösung befindet. Das ist aber abhängig von der zufälligen Gegenwart von Kristallisationszentren, so daß die Lösungen mitunter übersättigt sind. Auch diese Säuregärung scheint durch gewisse technische Verunreinigungen der verwendeten Zucker (Aktivatoren, Schwermetalle oder ähnliches) beträchtlich gefördert zu werden.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Pett, L. B., Beobachtungen an in Cyanid gezüchteter Hefe. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 806.)

Hefe wächst unter geeigneten Bedingungen in Medien, die bis zu M/500 Zyanid enthalten. Der Flavingehalt der Zyanidhefe ist zwei- bis dreimal größer als der aerob oder anaerob gezüchteten Hefe. Die Atmung auf Glukose ist sehr gering und wird durch Zyanid kaum gehemmt. Die aerobe Gärung der Zyanidhefe ist stärker als die Gärung aerober Hefe, aber geringer als die einer anaeroben Hefe. Der Pasteureffekt ist bei Zyanidhefe nicht nachweisbar. Die Zyanidhefe steht zwischen der aeroben Bäcker- und der anaeroben Brauereihefe.

Heuß (Berlin).

Renner, S., Beitrag zur Kenntnis einiger Wurzelpilze. (Phytopath. Ztschr. Bd. 8. 1935. S. 457—487.)

Verf.n hat Untersuchungen mit den Wurzelpilzen von Acer pseudoplatanus, Salix repens und Schoenus ferrugineus durchgeführt. Die Pilze, die durch Auslegen von kleinen Wurzelstücken auf Malzagar gewonnen wurden, konnten nicht bestimmt werden und wurden deshalb Myzelium Radicis genannt. Die Temperaturoptima liegen

bei 21—24° C. Wachstumsgeschwindigkeit und Steilheit der Kurve sind aber sehr verschieden. Alle verschieben die Reaktion der Nährlösung nach der alkalischen Seite. Mit dem Ahorn- und dem Weidenpilz wurden Versuche über ihre Fähigkeit der Stickstoffausnutzung durchgeführt, wobei unterschiedliche Eignung von Ammonverbindungen und Asparagin festgestellt wurde. Assimilation von Luftstickstoff ist unwahrscheinlich. Bei Schoenus ferrugineus wurden regelmäßig Hyphen in besonderen Pilzsäcken gefunden, bei Acer in der Rindenschicht, bei Salix in den Epidermiszellen. Schwächere Pflanzen z. B. in Wasserkulturen werden durch die Pilze zum Absterben gebracht, kräftige lassen dagegen keine Unterschiede zwischen den pilzfreien und den pilzbefallenen Formen erkennen. Daraus wird der Schluß gezogen, daß es sich um einen unter Umständen tragbaren Parasitismus handelt. Braun (Berlin-Dahlem).

Chester, K. S., Separation and analysis of virus strains by means of precipitin tests. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 778.)

Die früheren Versuche Verf.s und anderer Autoren, verschiedene Varianten („Stämme") desselben Virus serologisch zu differenzieren, waren erfolglos gewesen. Auch nachdem Verf. den Virusgehalt der Pflanzenextrakte einander adjustiert hatte, konnten merkliche Abweichungen zwischen den Stämmen nicht beobachtet werden. Erst bei Anwendung einer von Beale (1934) angegebenen Absorptionstechnik gelang Verf. im Präzipitationsversuch die Differenzierung von 10 Stämmen des Tabakmosaikvirus und 3 Stämmen des Latent potato mosaic-Virus (= X-Virus). Bezüglich des X-Virus kommt er zu der Vorstellung, daß die beiden Stämme „Potato mottle" und „Masked potato mottle" zwei Antigenfraktionen (als a und b bezeichnet) gemeinsam haben, daß sie sich aber durch die Fraktionen c und d unterscheiden. Andererseits sind den beiden Stämmen „Masked potato mottle" und „Potato ring spot" die Fraktionen a und d gemeinsam, sie unterscheiden sich durch die Fraktionen b und e. Die Antigen-Konstitution läßt sich bei den drei Stämmen durch folgende Formeln ausdrücken.

Potato mottle	a	b	c
Masked potato mottle	a	b	d
Potato ring spot	a	d	e

Dabei ist bemerkenswert, daß der zweitgenannte Stamm seinerzeit unter kontrollierten Bedingungen aus dem erstgenannten hervorgegangen war. — Entsprechende Vorstellungen werden auch bezüglich der untersuchten Tabakmosaikstämme entwickelt. E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Sevag, M. G. und Neuenschwander-Lemmer, E. N., Über die Dehydrierung von Milchsäure durch Staphylokokken. (Biochem. Ztschr. Bd. 286. 1936. S. 7—12.)

Das erstrebenswerte Ziel, bei biochemischen Untersuchungen mit möglichst einfachen Fermentsystemen zu arbeiten, ist bei den vorliegenden Versuchen besonders gut realisiert. Staphylococcus aureus und Staphylococcus albus dehydrieren Milchsäure, ohne diese weiter abzubauen. Es tritt keine Carboxylase in Tätigkeit. In dieser Hinsicht verhalten sich Staphylokokken wie die morphologisch ähnlichen Gonokokken und Pneumokokken. Bortels (Berlin-Dahlem).

Yamagutchi, S., Tamiya, H. und Ogura, Y., Über die Isolierung und die Eigenschaften der Indophenoloxydase aus Hefezellen und Herzmuskel. (Acta Phytochim. Vol. 9. p. 103—106. 1936.)

Es gelang Verff., aus Bäckerhefe durch Zugabe von NaCl und mit Hilfe verschiedener Extraktionsverfahren eine Indophenoloxydase zu gewinnen. Das mit K_2HPO_4 gepufferte Filtrat ($p_H = 7,3$) zeigte vor dem Erhitzen mit Nadireagens die Indophenolreaktion. Dehydrase-Systeme waren nicht vorhanden. In der eingeengten Enzymlösung fehlten Cytochrom und Hämochromogen. CN wirkt in Konzentrationen von m/10 000 stark hemmend, CO dagegen, selbst bei 95% Gehalt (5% O_2), übt keinerlei Einfluß aus. Es verhält sich somit die aus Hefezellen freigemachte Indophenolase wie diejenige von Lactarius, Micrococcus ochraceus, Pseudomonas und Milch. Für das aus Herzmuskel isolierte Enzym gilt das gleiche. Verff. sehen hierin eine Stütze für die Theorie von Shibata und Tamiya.

Skallau (Berlin).

Nilsson, R. und Alm, Fr., Zur Kenntnis der alkoholischen Gärung in dem intakten Fermentsystem der Hefezelle und in desorganisierten Zymasesystemen. I. (Biochem. Ztschr. Bd. 286. 1936. S. 254—278.)

Ausgehend von der Anschauung, daß die bei der Gärung intermediär auftretende Hexose-Monophosphorsäure zunächst zwischen dem dritten und vierten C-Atom in Glyzerin-3-Phosphorsäure und den nicht-phosphorylierten 3-Kohlenstoffkörper zerfällt, wird an einer besonders schonend hergestellten Trockenhefe der Einfluß gesteigerter Phosphatkonzentration und erhöhter Temperatur auf den Gärverlauf untersucht. Die dabei gemachten Beobachtungen, besonders hinsichtlich des in der Gärkurve auftretenden Knickpunktes, werden für theoretische Betrachtungen über den Gärverlauf ausgewertet. Bortels (Berlin-Dahlem).

Warburg, O. und Christian, W., Optischer Nachweis der Hydrierung und Dehydrierung des Pyridins im Gärungs-Co-Ferment. (Biochem. Ztschr. Bd. 286. 1936. S. 81—82.)

Gärungs-Co-Ferment enthält eine Pyridinbase, die als Wasserstoffüberträger wirkt. Bei Zusatz von Hexose-Monophosphorsäure wird sie hydriert und zeigt dann im Quecksilberlicht von der Wellenlänge 360 mμ weiße Fluoreszenz, die sofort wieder verschwindet, wenn Azetaldehyd zugegeben wird. Demnach entsteht Alkohol nach der Gleichung

Dihydropyridin + Azetaldehyd = Pyridin + Äthylalkohol

und Milchsäure nach der Gleichung

Dihydropyridin + Brenztraubensäure = Pyridin + Milchsäure.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Kirsh, D., Lipase Production of Penicillium oxalicum and Aspergillus flavus. (Bot. Gazette. Vol. 97. 1935. p. 321—333.)

Bei der Prüfung von Aspergillus, Penicillium, Oidium, Mucor, Trichoderma, Monilia, einigen Bakterien und Aktinomyzeten auf Lipaseproduktion erwiesen sich Aspergillus flavus und Penicillium oxalicum als besonders aktiv. In der Hauptsache kamen zwei Nährböden zur Anwendung: 1. ein Kleie-Holzmehl-Olivenöl, 2. ein Kleie-Sojabohnen-Substrat, denen noch Ammonphosphat zugesetzt wurde. Im Verlaufe der Untersuchung zeigte sich zwischen beiden Medien ein beträchtlicher Unterschied hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Lipaseproduktion: Während auf Nährboden 1 die Bildung des Enzyms nur langsam vonstatten ging (9% Hydrolyse und niedrig bleibende Verseifungszahl), war sie auf 2 ganz erheblich. Hier

wurden 35—50% des Öles in 20 Std. hydrolysiert. Ein Substrat mit 2,5—5% Öl ist für die Erzeugung von Lipase durch den Pilz am günstigsten, sie erfährt 3—4 Tage nach der Inkubation ihr Maximum, um dann sehr langsam abzunehmen. Selbst nach 30 Tagen konnten noch nennenswerte Mengen an Enzym extrahiert werden. Die optimale Temperatur liegt bei 28° C, die Kulturen müssen im Wasserbad angesetzt und gezogen werden, da sonst leicht infolge der Erzeugung von Eigenwarme durch den Pilz Temperaturerhöhungen auftreten, die einen Teil des Enzyms vernichten. Neben den oben angefuhrten Nahrböden wurden noch andere ausprobiert: Samen und deren Mehl von Baumwolle, Flachs, entölten Sojabohnen. Auf allen Böden bildeten die Pilze Lipase, jedoch erheblich weniger als auf den obengenannten. Der beste Boden für die Lipaseerzeugung ist nach den Untersuchungen des Verf.s ein Sojabohnenmedium, wobei das Verhältnis von Sojabohnen zu Kleie zweckmäßig 7,5 : 12,5 zu wählen ist. Der Ertrag ist hier zweimal so groß wie auf Sojabohnenmehl. Auch der Phosphatgehalt spielt eine Rolle: Mehr als 2% wirken hemmend auf die Erzeugung. Merkwürdigerweise war die Aktivitat eines Enzyms, das von großflächigen Kulturen gewonnen war, geringer als diejenige der Kulturen bis zu 40 g Nahrsubstanz. Das aus einem Extrakt von P. o. durch Alkohol gefallte Enzym enthielt 8 + ½ mal mehr Lipase pro Einheit Protease als das Lipase-Trypsin (Pankreas) des Handels.

Skallau (Berlin).

Johnson, M. J., Berger, J. und **Petterson, W. J.**, Bestandteile des proteolytischen Komplexes gewisser Schimmelpilze. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 786.)

Man fand in 30 verschiedenen Schimmelpilzarten eine ganze Anzahl verschiedener Peptidasen und erhebliche Unterschiede im Verhältnis der Wirksamkeit gegenüber 2 verschiedenen Substraten. Es wechselte beispielsweise das Verhältnis Leucyldiglyzin-Wirksamkeit zu Triglyzin-Wirksamkeit von 0,6 in Aspergillus niger bis zu 74 in P. terrestre.

Heuß (Berlin).

Kuhn, R., Wirkstoffe in der belebten Natur. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 49. 1936. S. 749—750.)

Zwischen den Nährstoffen und den Wirkstoffen, welche die Pflanze benötigt, gibt es keine scharfe Trennung. Die Zellteilung und das Plasmawachstum werden von den Biosfaktoren beherrscht, die Zellstreckung von den Auxinen. Ähnliche Vorgänge finden auch im Tierkörper statt, wo Vitamine aufgenommen und Hormone erzeugt werden. Bei dem Vitamin B_2, dem sog. Laktoflavin, ist die Aufklärung der Konstitution und die Synthese bereits gelungen. Aus ihm bildet sich im Körper das „gelbe Ferment". Auch diese Umwandlung kann künstlich vollzogen werden: wenn man die Farbstoffkomponente — die Laktoflavin-5'-Phosphorsäure — mit dem aus Bierhefe gewonnenen Träger des gelben Ferments kuppelt, so erhält man ein mit dem natürlichen völlig identisches künstliches Ferment. Es wird möglich sein, auch aus anderen synthetischen Flavinen künstliche Fermente darzustellen, so daß man, unabhängig von Zellen und Geweben, in Zukunft über die Wirksamkeit synthetischer Wachstumsstoffe wird entscheiden können.

Heuß (Berlin).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Tanner, F. W., Mikrobiologie der Lebensmittelkonserven. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 778.)

Durch rasches Gefrierenlassen frischer Lebensmittel kann man diese für kurze Zeit konservieren, weil dadurch die Wirksamkeit der Mikroorganismen zwar nicht zerstört, aber gehemmt wird. Lebensmittelkonserven in hermetisch abgeschlossenen Behältern sind bisher für steril angesehen worden, in Wirklichkeit enthalten sie aber zahlreiche lebensfähige Mikroorganismen.

Heuß (Berlin).

Stark, C. N., and Patterson, M. C., The heat resistance of colon organisms in milk. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 495.)

Zu den Untersuchungen waren 500 Reinkulturen von Coli aerogenes-Organismen frisch aus Wasser, roher und pasteurisierter Milch sowie menschlichen und tierischen Fäkalien isoliert worden. Wurde Milch mit 24 Std. alten Bouillonkulturen entsprechend beimpft, dann enthielt diese pro Kubikzentimeter ungefähr 100 Millionen Testbakterien. Derartige Aufschwemmungen in Milch wurden in jeweils 3 Parallelröhrchen zu den Resistenzversuchen herangezogen. Ergebnisse: 96% der Kulturen konnten eine Erhitzung auf 60° C während 30 Min. nicht aushalten. Von den übriggebliebenen 18 Kulturen wurden 14 bei 61,5 C während 30 Min. abgetötet und die 4 übrigen Kulturen bei 62,8° C während 30 Min. Daraus läßt sich schließen, daß das Vorhandensein von Colibakterien in pasteurisierter Milch in der Hauptsache auf Re-Infektion zurückzuführen ist.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Gorini, C., Physiologische Typen der Milchbakterien. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 778.)

In der Milch kommen 3 physiologische Typen von Bakterien vor: azidoproteolytische, thermophile und thermoresistente. Die ersten peptonisieren im sauren Medium und erzeugen Proteinasen und Peptidasen mit einem p_H-Optimum im sauren Bereich. Die Aufbewahrung pasteurisierter Milch hängt von der Güte der beiden andern Gruppen ab. Heuß (Berlin).

Davis, J. G., Atmungs- und Gärungsmechanismus der Milchsäurebakterien. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 778.)

Milchsäurebakterien sind in der Milch und im Käse vorherrschend, weil sie Kasein verarbeiten können, Milchzucker vergären und durch die Anwesenheit von Sauerstoff begünstigt werden. Geschwächte Kulturen weisen Sauerstoffempfindlichkeit auf, weil das Gleichgewicht zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit des atmosphärischen Sauerstoffs in das Medium und in die Zelle bzw. der Entfernung dieses Sauerstoffs durch die Zwischenprodukte der Gärung gestört ist. Der zweite Vorgang verläuft bei geschwächten Milchsäurekulturen langsamer als der erste. Heuß (Berlin).

Sherman, J. M., and Hodge, H. M., The characteristics of freshly isolated cultures of Lactobacillus bulgaricus. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 494.)

Da die meisten unserer Kenntnisse über den Lactobacillus bulgaricus an Hand von jahrelang künstlich fortgezüchteten Stämmen gewonnen worden sind, schien es von Interesse, auch einmal eine größere Anzahl von Bulgaricus-Stämmen (200) unmittelbar nach ihrer Isolierung aus frischer Milch zu untersuchen. Ergebnisse: Die frisch isolierten Stämme unterschieden sich von den üblichen Laboratoriumskulturen dadurch, daß sie nur ungefähr 1% Milchsäure in Milch bildeten, streng anaerob waren und ein Temperatur-Maximum bei ungefähr 60° C besaßen. Nur sehr wenige frisch isolierte Stämme hatten maximale Wachstumstemperaturen um 50° C herum. 15 Kulturen zeichneten sich dadurch aus, daß sie Saccharose vergärten, 1,25—2% Säure in Milch bildeten und weiterhin ein etwas niedrigeres Temperatur-Maximum hatten. Diese Varietät entspricht denjenigen Mikroorganismen, die durch schweizerische und amerikanische Autoren

irrtümlicherweise beim Thermobacterium lactis von Orla-Jensen eingereiht worden sind.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Burkey, L. A., Sanders, G. P., and Cone, J. F., The significance of bacterial and chemical changes occurring in mastitis milk and their correlation with milk production. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 496.)

An Hand wöchentlich vorgenommener Untersuchungen an der Erstmilch von Kalbinnen konnte gezeigt werden, wie mehr oder weniger große Veränderungen in der Zusammensetzung der Milch gleichzeitig mit dem Fortschreiten der Krankheit Hand in Hand gehen.

Es kann eine Milch mehrere 100 000 Leukozyten und mehrere 100 Mastitis-Streptokokken pro Kubikzentimeter (Plattenzählung) aufweisen, ohne irgendwelche Zeichen chemischer oder physiologischer Abnormität auf Grund von Mastitiserkrankung. Es konnten häufig Fälle beobachtet werden, in denen die Milch große Mengen von Leukozyten und Fibringerinnsel enthielt und sogar bei der Labgerinnung abnorm war, ohne daß es möglich gewesen wäre, eine gewisse Anzahl von Mastitis-Streptokokken nachzuweisen. Ein derartiger Zustand mag, wenn auch noch nicht als eigentliche Mastitis, so doch als sehr günstige Vorbedingung für eine Invasion von Streptococcus mastitidis betrachtet werden. Bei der endgültigen Streptokokkeninfektion enthält die Milch große Mengen von Strept. mastitidis und Millionen von Leukozyten und zeigt weitere anormale Besonderheiten, wie z. B. Verlust der Labgerinnung, Ansteigen der Chloride und einen deutlichen Rückgang der Milchmenge. Während des Höhepunktes der Infektion erreichen auch die Streptokokken und Leukozyten ein Maximum. Der Chloridgehalt beträgt in der Regel 0,14%, die Labfähigkeit ist vollständig verschwunden, die H-Ionen-Konzentration deutlich erniedrigt, der Prozentsatz von Nichtkasein-Stickstoff wesentlich erhöht und der Rückgang in der Milchmenge ist noch stärker. Wenn die Infektion nachläßt, verschwinden auch die infektiösen Krankheitskeime, das p_H der Milch erreicht ein Maximum, die Chloride und Leukozyten gehen zurück, während gleichzeitig die Körperzellen vorherrschen. Im selben Maße, als sich die Kuh von der Infektion erholt hat, verschwinden die anormalen Eigenschaften der Milch schrittweise, mit der Ausnahme, daß die Zahl der Körperzellen groß bleibt und daß der Milchrückgang auch während der übrigen Laktationszeit bestehen bleibt.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Lebedewa, N., Das Wachstum der Kefirpilze. (Probleme d. Tierzucht. Bd. 3. 1934. S. 145.) [Russisch.]

Die optimale Temperatur für das Wachstum der Kefirpilze war 16° C, bei einer solchen von 22° und 28° C wurden keine günstigen Resultate erzielt, da sich die Milch bald mit einem dicken Häutchen von Oidium lactis u. a. überzogen hat, während die Kefirpilze schneeweiß und schleimig wurden und in ihrem Gewicht merklich abgenommen hatten. Als optimale Milchmenge hat sich eine solche vom 10fachen Gewicht des Pilzes erwiesen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt beim täglichen Wechseln der Milchproben (mit Separator bearbeitete und dann 15 Min. lang bei 63° C pasteurisierte Milch) und viermaligem täglichen Aufschütteln.

M. Gordienko (Berlin).

Wojtkewitsch, A. F., Über die Methodik der mikrobiologischen Prozesse in Milcherzeugnissen. (Die Milchindustrie UdSSR. Nr. 2. 1936. S. 32—34.) [Russisch.]

Es wird oft zum Studium der Dynamik der mikrobiologischen Prozesse in verschiedenen Nahrungs- und Futtermitteln (Milch, Silage u. ä.) die sog. Zählmethode der Mikroorganismen (Milchsäure-, Buttersäurebakterien, Coli aerogenes usw.) benutzt. Diese Methode ist jedoch nicht vollkommen, da sie nur die Mikroorganismenmenge und nicht ihre Aktivität zum Ausdruck

bringt. Verf. schlägt folgende Methode vor, die die „summare Gärungsenergie“ für jede Mikroorganismengruppe ergibt: bei der Untersuchung der Milchsäurebakterien werden die Proben 16—18 Std. lang in Thermostaten bei einer Temperatur um 30° C gehalten, wonach die Bestimmung des Säuregrades erfolgt, bei der Untersuchung der Buttersäurebakterien, Coli aerogenes und Hefe wird die ausgeschiedene Gasmenge bestimmt (Kölbchen mit Mannit bei 18—24stünd. Aufbewahrung um 37—40° C herum).

M. Gordienko (Berlin).

Leifson, E., New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogenes and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. (Journ. of Path. and Bact. Vol. 40. 1935. p. 581—599.)

Der Bericht über die Arbeit möge auf den Nachweis der Coli aerogenes-Gruppe in Milch und Wasser beschränkt bleiben. — Einleitend sehr interessante Ausführungen über die Einwirkung der vielfach zu Anreicherungsnährböden verwendeten Galle und ihrer Bestandteile auf die Bakterien. Ein bis jetzt von der bakteriologischen Wissenschaft vernachlässigter Bestandteil derselben ist die Desoxycholsäure. Nur ihre Alkalisalze sind sehr leicht löslich, und zwar von p_H 7,5 aufwärts, zwischen p_H 6,5 und 7,5 bildet sie in nicht zu stark verdünntem Zustande ein Gel, was für die Herstellung eines desoxycholathaltigen Nährbodens und für die Beurteilung der darauf wachsenden Bakterienkolonien von Wichtigkeit ist (Auftreten bizarrer Formen). Natriumdesoxylat hat auf gewisse Bakterien eine stark auflösende bzw. wachstumshemmende Wirkung, viel stärker als die Galle. Während gramnegative Darmkeime zwischen p_H 6,5 und 8,0 damit noch ein gutes Wachstum zeigen, ist dies bei grampositiven Darmstreptokokken in geringerem Grade erst zwischen p_H 9,0 und 9,5 der Fall, während Mikrokokken und nicht aus dem Darm stammende Streptokokken innerhalb dieser p_H-Grenzen nur ein geringes und die übrigen grampositiven Keime fast überhaupt kein Wachstum mehr aufweisen. Die im vorliegenden Bericht für Milchuntersuchung gegebene Nährboden-Zusammensetzung hat Verf. (laut persönlicher Mitteilung an den Referenten) wegen seiner zu stark bakteriziden Wirkung inzwischen modifiziert, weshalb im folgenden das neue Rezept gegeben sei: Pepton (Witte, Proteose) 1%, Laktose 1%, Natriumchlorid 0,5%, Natriumzitrat (2 H_2O) 0,2%, Natriumdesoxycholat 0,05%, Neutralrot 0,0033%, Agar 1,5%, p_H 7,2. Auf diesem Nährboden wachsen Coli- und Aerogenes-Bakterien innerhalb 15—20 Std. zu großen roten Kolonien aus. Zu dieser Zeit sind evtl. vorhandene Kolonien anderer Bakterien noch unsichtbar. Es ist sehr zweckmäßig, Oberflächenwachstum von Kolonien dadurch zu vermeiden, daß man auf den erstarrten beimpften Agar eine weitere Schicht Agar gießt (kann gewöhnlicher Wasseragar sein). Die Tiefenkolonien von Aerogenes-Bakterien entfärben sich dann wieder nach 24 Std., während Coli-Bakterien ihre Farbe behalten. Die Frage der Differenzierung dieser beiden Arten mit Hilfe dieses Agars soll noch weiter bearbeitet werden. Der Agar kann in der für Milch angegebenen Zusammensetzung auch für die Wasseruntersuchung verwendet werden. Nur muß bei sehr stark kalkhaltigem Wasser die Menge des Desoxycholats entsprechend der zu erwartenden Ausfällung erhöht werden.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Frazier, W. C., Long, H. F., and Johnson jr., Wm. T., The bacteriology of swiss cheese. V. The use of Streptococcus thermophilus in ripening milk for swiss cheese. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 535—539.)

In spontan reifender Milch ist es immer schwer, das Wachstum nicht erwünschter Keime im Zaum zu halten. So lag der Gedanke nahe, die Reifung künstlich mit Str. thermophilus durchzuführen, und zwar unter kontrollierten Bedingungen bei Temperaturen, die das Wachstum anderer unerwünschter Organismen ausschließen. Die verschieden ausgeführten Reifungs- und Käsereiversuche hatten folgendes Ergebnis: Das Reifen der Milch durch Beimpfung mit Str. lactis oder Str. thermophilus über Nacht bei Temperaturen zwischen 20 und 25° C ergab keine befriedigenden Ergebnisse, desgleichen nicht die Zufügung von Str. lactis-Säurewecker direkt zu der Kesselmilch. Wurde aber Str. thermophilus getrennt für sich in auf 48—50° C erhitzter Milch nur während 30—60 Min. vorkultiviert und dann in einer Menge von ein Fünftel zu der übrigen Kesselmilch gefügt, dann war das Ergebnis zufriedenstellend, besonders dann, wenn die Methylenblau-Reduktionszeit der Kesselmilch 5 bis 6 Std. oder länger war. Hinsichtlich der Keimzahlverhältnisse ergab sich zunächst wohl eine stärkere Erhöhung der Zahl dieser thermophilen Organismen in der Kesselmilch. Unter der Presse vermehrten sie sich aber nur sehr langsam oder gar nicht. Was die p_H-Werte im Käseinnern betrifft, so waren sie bei den Käsen mit getrennt vorgereifter Str. thermophilus-Milch in den ersten Stunden nach der Fabrikation niedriger als bei den normalen Vergleichskäsen, nach 21 Std. dagegen war es umgekehrt. Für die Praxis ergibt sich die Schlußfolgerung, daß das Verfahren, einen Teil der Kesselmilch mit Str. thermophilus vorzureifen, dann zweckmäßig ist, wenn die Milch schlecht reift und der Käsebruch nicht den richtigen Griff bekommt. Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Babel, F. J., and Parfitt, E. H., A comparison of media used for determining the bacterial content of ice cream. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 19. 1936. p. 497—498.)

Bei der bakteriologischen Prüfung von 133 Rahm-Eisproben aus dem Handel konnten folgende Erfahrungen gemacht werden:

Trypton-Glukose-Magermilch-Agar nach Bowers und Hucker lieferte höhere Gesamtkeimzahlen als der Standardagar mit und ohne 1% Saccharose, besonders dann, wenn die Proben einen Gesamtkeimgehalt von weniger als 50 000 pro Kubikzentimeter aufwiesen. Beim Nachweis der Coli aerogenes-Gruppe (Verimpfung von jeweils 0,1 ccm der Rahmeisproben) zeigte sich, daß Natriumformiatricilloneat-Bouillon und Brillantgrüngalle-Bouillon mehr positive Resultate lieferten, als wenn die Proben auf Leifsons Natriumdesoxycholat-Agar oder Violettrotgalle-Agar verarbeitet wurden. Während zwischen den beiden Bouillonarten kein Unterschied gefunden werden konnte, wurde mit Violettrotgalle-Agar ein höherer Prozentsatz positiver Proben erhalten als mit Leifsons Agar. Weiterhin erwies sich, daß Rahmeisproben mit einer Coli aerogenes-Zahl von mehr als 500 pro Kubikzentimeter immer auch hohe Gesamtkeimzahlen besaßen und daß Proben mit geringen Gesamtkeimzahlen nur wenig oder gar keine positiven Coli aerogenes-Befunde aufwiesen.

Die aufgefundene direkte Beziehung zwischen dem Ergebnis der Pilz- und Hefekeimzahlbestimmung und der Gesamtkeimzahl zeigte schließlich, daß die Pilz- und Hefekeimzahl sehr wohl als ein Maßstab für saubere Betriebsführung zu gebrauchen ist.

Karl J. Demeter (München-Weihenstephan).

Tohyama, Y., and Yasukawa, Purification of Polluted Oysters. (Bull. Japan. Soc. Scient. Fisheries. Vol. 4. Nr. 3. 1935. p. 176—182.) [Japanisch, engl. Zusfassg.]

Die Gefahr der Übertragung von Typhus und anderen Darmerkrankungen durch den Genuß roher Austern ist durch epidemiologische Untersuchungen belegt. Bakteriologische Untersuchungen Tohyjamas an Austern der wichtigsten japanischen Austernbänke ergaben, daß 10% der japanischen Austern einer reinigenden Vorbehandlung bedürfen, ehe sie für den menschlichen Genuß geeignet sind. Diese Reinigung kann dadurch vollzogen werden, daß die Austern aus dem verschmutzten Seewasser für einige Zeit in reines Wasser gebracht werden. Vielfach konnte jedoch im engeren Umkreise kein geeignetes reines Seewasser gefunden werden, so daß in diesen Fällen eine künstliche Reinigung notwendig war. Durch Beobachtung der Abnahme der Colizahl infizierter Austern wurde der Wert verschiedener künstlicher Reinigungsmethoden untersucht. Diese Methoden beruhen im wesentlichen auf wiederholter Überführung der Tiere in chloriertes Seewasser. So kann die Reinigung von 100—200 Austern in 0,5 cbm fassenden Holzbottichen in 1—7 Tagen, je nach der Verunreinigung des verwendeten Seewassers durchgeführt werden. C. R. Baier (Kiel).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Felsz-Karnicka, H., Sur la décomposition de la cellulose dans les sols acides. (Mémoires de l'Inst. Nat. Polon. d'Econom. Rurale á Pulawy. T. 16. Mémoire 240. 1936. p. 1—48.) [Poln. m. franz. Zusfassg.]

Saure Böden wurden auf ihren Gehalt an zellulosezersetzenden Pilzen untersucht, der mit der Düngung stark wechselt. Der größte Einfluß ging von der Stickstoffdüngung aus. Während in neutralen Böden die zellulosezerstörenden Bakterien vorherrschten, waren es in den sauren Böden die Pilze. 13 verschiedene Arten wurden bestimmt, von denen 8 bisher noch nicht als Zellulosezersetzer beschrieben worden sind. Von allen sind auf Tafeln Zeichnungen beigefügt. Bortels (Berlin-Dahlem).

Mischustin, E. N. und Scharypow, A. O., Die Reaktion des Bodens auf die Sterilisation mit Hilfe der mikrobiologischen Methode. (Die Chemisation d. soz. Landw. Bd. 5. 1936. S. 64—72.) [Russisch.]

Es wurde die Wirkung des Chlorpikrins, Azetons und Phenoltrichlorids auf das Wachstum einiger Gemüsearten (Gurken, Salat usw.) in Gewächshäusern untersucht, wobei die aufgezählten Verbindungen im Boden in eine Tiefe von 7 cm gebracht bzw. (wie Phenoltrichlorid) auf den Boden gestreut und dann eingeharkt wurden. Die Versuche zeigten, daß die aufgezählten Verbindungen eine bedeutende Ertragssteigerung der Gemüsearten hervorrufen, die vor allem durch die Erhöhung der Menge des leichtlöslichen Stickstoffs im Boden bedingt wird. Die mikrobiologische Untersuchung wies auf eine stärkere Entwicklung des Azotobakters in dem mit den Verbindungen (Phenoltrichlorid) behandelten Boden (gegen den nicht-behandelten) hin. Diese Tatsache läßt sich durch die Fähigkeit des Azotobakters erklären, aromatische Kohlenwasserstoffe zu assimilieren (Winogradsky).

M. Gordienko (Berlin).

Dagnini, C. M., Biodynamics of cloddy chernozem of the Troitsk district, Chelabinsk province. (Bull. Inst. Rech. Biol. Perm. Vol. 10. 1936. p. 201—210.) [Russ. m. engl. Zusfassg.]

Es wurde die Zahl der Mikroorganismen nach der Methode von Germanow geschätzt, die Intensität der Ammonifikation, Nitrifikation, Denitrifikation und Stickstoffbindung und das Phosphor- und Kalkbedürfnis verschiedener natürlicher Horizonte bestimmt. Die Zahl der Mikroorganismen in den Bodenproben ist hoch. Sie nimmt zur Tiefe hin ab und wird durch die Bodenbearbeitung beeinflußt. In allen Proben und Horizonten wurde Azotobakter nachgewiesen. Die Ammonifikationskraft ist gering und nimmt zur Tiefe hin ab. Die Intensität der Nitrifikation wird durch anorganische und organische Stickstoffzufuhr und durch die Bodenbearbeitung gesteigert. Der Boden besitzt eine große Denitrifikationskraft, die mit der Tiefe ansteigt.

C. R. Baier (Kiel).

Szilvinyi, A. v., Zur mikrobiologischen Kenntnis der Tobaheide auf Sumatra. (Arch. f. Hydrobiol. Suppl. Bd. 14. „Trop. Binnengewässer." Bd. 6. 1936. S. 512—552.)

Aus Bodenproben der Tobaheide der Deutschen Limnologischen Sundaexpedition wurden 15 verschiedene Schimmelpilzarten, darunter 4 bisher unbekannte isoliert. Eine Ähnlichkeit der Zusammensetzung der Pilzflora mit der europäischer Heideböden konnte nicht festgestellt werden. Doch besteht die Möglichkeit, daß die Sporen, der in letzteren dominierenden Mucorineen während der langen Aufbewahrungszeit ihre Keimfähigkeit verloren haben. Die aus dem tropischen Boden isolierten Stämme zeichnen sich den europäischen Stämmen der gleichen Arten gegenüber durch höherliegende Temperatur-Kardinalpunkte aus. C. R. Baier (Kiel).

Castellani, E., Les microorganismes et l'absorption polaire du sol. Note II. Variations du rapport Ca/Mg. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 8. 1936. p. 56—59.)

Nachdem vom Verf. früher schon auf die Bedeutung der Mikroorganismen für die Überführung wasserunlöslicher Kalziumverbindungen des Bodens in wasserlösliche und in austauschbares Kalzium hingewiesen worden ist, hat er diese Untersuchungen nun auch auf Magnesium und auf das landwirtschaftlich wichtige Verhältnis Ca/Mg ausgedehnt. Er findet, daß die Mikroorganismen auch an der Umwandlung der im Boden vorhandenen Verbindungen des Magnesiums maßgeblich beteiligt sind. Kalzium wie Magnesium werden unter dem Einfluß der Mikrobentätigkeit aus wasserunlöslichen Verbindungen in Lösung gebracht und dann von den Bodenkolloiden absorbiert. Diese Absorption ist aber bei Kalzium größer als bei Magnesium, so daß das Verhältnis Ca/Mg in der Bodenlösung unter dem Einfluß der Mikrobentätigkeit allmählich kleiner wird.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Sparrow, F. K, Biological Observations on the Marine Fungi of Woods Hole Waters. (Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. Vol. 70. 1936. p. 236—263.)

18 marine Pilze, meist Phykomyzeten, darunter 2 neue Gattungen und Arten, aus der Umgebung von Woods Hole werden beschrieben. Die Tatsache, daß mehrere derselben auch in europäischen und arktischen Meeren gefunden wurden, läßt auf eine weite Verbreitung dieser Organismen schließen. Sie treten — bis auf einen — als Parasiten, Saprophyten oder fakultative

Saprophyten von Algen auf. Ihre Bedeutung für den Stoffhaushalt des Meeres als Reduzenten und Humusbildner wird besprochen.

C. R. Baier (Kiel).

ZoBell, C. E., and McEven, G. F., The Letal Action of Sunlight upon Bacteria in Sea Water. (Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. Vol. 68. 1935. p. 93—106.)

Die vertikale, tägliche und jahreszeitliche Verteilung der Bakterien im Meere zeigen keine tödliche Wirkung der Sonnenstrahlung an. Wenn auch die jahreszeitlichen Schwankungen der Bakterienzahl umgekehrt proportional der Intensität der Sonnenstrahlung sind, so sind daran jedoch mannigfache andere Faktoren beteiligt. Laboratoriumsversuche lassen auf eine schwache letale Wirkung des Sonnenlichtes in den obersten Millimetern des Wassers schließen. Die bakterizide Strahlung durchdringt eine Schicht von 3 m Seewasser nicht, und ihre Intensität wird schon durch eine Schicht von 10 cm wesentlich abgeschwächt. C. R. Baier (Kiel).

Waksman, S. A., and Renn, C. E., Decomposition of Organic Matter in Sea Water by Bacteria. III. Factors Influencing the Rate of Decomposition. (Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. Vol. 70. 1936. p. 472—483.)

Es wird von Laboratoriumsversuchen über den Abbau organischer Substanz in Seewasser unter verschiedenen Bedingungen (Zugabe anorganischer und organischer N-Quellen, verschiedene Belichtung, Filtration des Wassers) berichtet. Als Maß für den Abbau diente die Sauerstoffzehrung. Die Geschwindigkeit der Mineralisation organischen Stickstoffs soll an dem Ausmaß des Glukoseabbaus erkennbar sein. Die Menge leicht angreifbarer organischer Stoffe ändert sich mit dem Ausmaße der Produktion organischer Substanz, der Photosynthese, der Tiefe des Wassers und der geographischen Breite. Es scheint, daß der plötzliche Temperaturwechsel, dem die Wasserproben bei der Überführung in das Laboratorium ausgesetzt sind, nicht nur eine quantitative, sondern auch eine qualitative Veränderung der biologischen Prozesse bedingt. Diese Tatsache beeinträchtigt den Wert der Untersuchungen nicht, wenn man beachtet, daß ihre Ergebnisse kein Maß für die aktuellen Prozesse unter natürlichen Bedingungen, sondern nur ein Vergleichsmaß für die Prozesse einer jeden Versuchsreihe darstellen. C. R. Baier (Kiel).

Klie, H. E., Der Nachweis von Keimen der Art Bacterium coli und deren Formen in der Kieler Bucht. Inaug.-Diss. Kiel 1936. 136 S.

Es werden zunächst die zum Nachweis von Bact. coli benutzten, sog. mutmaßlichen Teste kritisch besprochen. Die Lackmusmilchprobe ist nicht brauchbar. Der Thermophilentiter bei 45° in Durham-Röhrchen mit gepufferter Eijkman- bzw. Bulirnährlösung, verbunden mit einem Sekundärnachweis auf Differentialnährböden wird als sehr praktisch empfohlen. Für die Untersuchung von 25—50 ccm Proben wird eine dreifach konzentrierte Milchzuckerbouillon mit Metachromgelb und Wasserblau vorgeschlagen. Ein Indoltiter bei 45° gibt keine befriedigenden Resultate. — Die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Probenahmen werden, nach Entfernungskreisen von der Bülker Abwassereinleitungsstelle geordnet, tabellarisch angeführt. Sie zeigen eine deutliche, von Strömungsverhältnissen u. a. Faktoren beeinflußte Abnahme der Fäkalverunreinigung mit zunehmender Entfernung von der

Abwassereinleitungsstelle an. Die Ergebnisse der verschiedenen Teste werden miteinander verglichen. — Zur Systematik der Coli-Gruppe wird eingehend Stellung genommen und eine scharfe Trennung der „Art Bacterium coli und ihrer „formae“ (= Standortsvarietäten, Rassen)“ und der „Coliähnlichen Arten“ und deren „formae“ gefordert. Für die Art Bact. coli wird der Versuch einer Beschreibung der Normalform und deren Variationsbreite und eine Abgrenzung gegen die Coli-ähnlichen Arten gemacht. Die daran anschließenden, z. T. beachtenswerten systematischen Ausführungen sind im Original nachzulesen. — An Hand der Ergebnisse der bakteriologischen Bearbeitung der Wasserproben und von Laboratoriumsversuchen wird auf die Probleme der Selbstreinigung der Gewässer und der Wasserhygiene eingegangen. C. R. Baier (Kiel).

Korr, J. M., The Relation between Cell Integrity and Bacterial Luminescence. (Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. Vol. 68. 1935. p. 347—354.)

Die Zellen dreier Arten von Leuchtbakterien aus Süß- und Seewasser wurden durch Zytolyse mit Chloroform und Caprylalkohol, durch osmotische Zytolyse, durch Autolyse bei 38°, durch mechanische Bearbeitung und durch Schallwellen zerstört bzw. verletzt. Die Versuche wurden so durchgeführt, daß eine Oxydation des Luciferins bei der Präparation vermieden wurde und die allgemeinen Bedingungen für eine Biolumineszenz gegeben waren. Es konnte jedoch in keinem Falle die Luciferin-Luciferase-Reaktion oder eine Lumineszenz beobachtet werden. Es kann daraus geschlossen werden, daß die Lumineszenz an die Zellstruktur gebunden ist. C. R. Baier (Kiel).

Pilwat, H., Veränderlichkeit von Stickstoffverbindungen (NO_2, NO_3 und NH_3) im Ostseewasser. (Angew. Chemie. Bd. 48. 1935. S. 590—591.)

Die Stickstoffverbindungen des Seewassers erleiden nach der Probenahme bereits in den ersten Stunden eine z. T. recht starke Konzentrationsänderung, die auf bakterielle Prozesse zurückgeführt werden. Für NO_2 werden Beziehungen zwischen Konzentrationsänderungen und Temperaturänderung der Wasserprobe vermutet. Der Nitratgehalt des Wassers war im Mai hoch und im Oktober niedrig, der Ammoniakgehalt im Mai niedrig und im Oktober hoch. Es wird daher auf ein Maximum der Mineralisation im Herbst und der Nitrifikation im Winter geschlossen. Warum jedoch eine direkte Assimilation von NH_3 in Frage gestellt wird, ist nicht ersichtlich.

C. R. Baier (Kiel).

Kusnetzow, S. J., Das Oxydoreduktionspotential in den Seen und die Methode seiner kolorimetrischen Bestimmung. (Arb. Limnol. Stat. Kossino. Bd. 20. 1935. S. 55—65.) [Russ. m. dtsch. Zusfassg.]

Die Verbreitung der Mikroorganismen in den Gewässern wird durch verschiedene physikalische und chemische Milieufaktoren reguliert. Unter diesen sind die Oxydoreduktionsbedingungen wesentlich. In verschiedenen russischen Seen wurden die Oxydoreduktionspotentiale des Schlammes und Wassers bestimmt. Die elektrometrische Methode der r_H-Bestimmung stieß im Wasser auf eine Reihe von Schwierigkeiten. Deshalb wurde eine kolorimetrische Methode ausgearbeitet. Sie beruht auf einer vom r_H abhängigen Wiederfärbung reduzierten Methylenblaus. Die Herstellung der Leukobase

wird ausführlich beschrieben. — Das Oxydoreduktionspotential des Schlammes schwankt unabhängig vom Chemismus zwischen 9—14, r_H. Das r_H des Wassers ändert sich in den Perioden der Sommer- und Winterstratifikation von 29 an der Oberfläche bis 12—14 in der Tiefe. Auch nach völliger Zehrung des Sauerstoffs in der Tiefe sinkt das Potential weiter, was auf das Vorhandensein anderer Reduktionsprozesse im Wasser hinweist.

C. R. Baier (Kiel).

ZoBell, C. E., and Allen, E. C., The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. (Journ. Bact. Vol. 29. 1935. p. 239—251.)

Mit Hilfe untergetauchter Objektträger wurde festgestellt, daß die erste Bewuchsschicht auf Unterwasserflächen vorwiegend durch Bakterien gebildet wird. Auch von älteren, vom Schiffsboden abgeschabtem Bewuchs wurde in Übereinstimmung mit anderen Autoren festgestellt, daß er z. T. (8—9 % des Volumens) aus Bakterien besteht. Die sehr bald gebildete Bakterienschicht erleichtert anderen Organismen das Anheften auf den Flächen. Diese Tatsache ist für den Schiffbau von Bedeutung. Die Zahl der in den ersten 48 Std. angehefteten Bakterien schwankte bei wöchentlichen Untersuchungen im Laufe eines halben Jahres stark. Diese Schwankungen zeigten aber keine Parallele zu der der Bakterienzahl pro ccm Wasser. Von 73 Reinkulturen von Seewasserbakterien waren nur 24 befähigt sich auf Objektträger festzuheften. C. R. Baier (Kiel).

Rubentschik, L., Roisin, M. B., and Bieljansky, F. M., Adsorption of Bacteria in Salt Lakes. (Journ. Bact. Vol. 32. 1935. p. 11—31.)

Durch Schütteln von Bakteriensuspensionen mit Limanschlamm und Bestimmung der Dichte der Suspension vor und nach dem Schütteln wird eine Adsorption der Bakterien an den Schlamm nachgewiesen. Das Ausmaß der Adsorption ist verschieden je nach der Art des Schlammes und der Bakterien. Schlammbakterien werden schneller adsorbiert als Wasserbakterien. Diese Tatsache mag zur scharfen Differenzierung zwischen Plankton- und Benthosbakterien der Limane beitragen. Durch Behandlung mit HCl wird die Adsorptionskraft des Schlammes wesentlich herabgesetzt. Durch Schütteln eines beimpften Schlammes mit sterilem Wasser wird umgekehrt eine Desorption, d. h. ein Übergehen der Bakterien des Schlammes in das Wasser, nachgewiesen. Die adsorbierten Bakterien leben im Schlamm weiter, jedoch unter teilweiser Änderung ihrer Stoffwechselintensität. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die Adsorption der Bakterien ein wesentlicher ökologischer Faktor bezüglich der Wechselwirkung zwischen Bakterium und Medium in Salzgewässern ist, und daß die Bestimmung der Bakterienadsorption wesentlich zur Differenzierung verschiedener Schlämme beitragen kann. C. R. Baier (Kiel).

Strell, M., Die Abwässer des Gärungsgewerbes, ihre Eigenschaften, Reinigung und Verwertung. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 284—286.)

Die Abwässer gärungsgewerblicher Betriebe enthalten von Schmutzstoffen im wesentlichen Dextrin, Melanoidine, Zucker und zuckerähnliche Stoffe, Solanin, Harze, Gummi, Stärke, organische Säuren, große Mengen von Kochsalz (Sauerkrautfabriken). Diese Abwässer sind stark gärungs- und fäulnisfähig, besitzen eine hohe Sauerstoffzehrung und geben zu starken

Pilzwucherungen Anlaß. Bei der Beseitigung dieser Abwässer ist zu unterscheiden zwischen Einzelbehandlung an den Stätten ihres Anfalls und gemeinsamer Behandlung durch Einleitung in ein städtisches Kanalnetz. Bei Einzelbehandlung kommen für die Unterbringung der Abwässer in Frage: a) der gewachsene Boden (Äcker, Wiesen, Felder und Gärten); b) der Untergrund (Grundwasserträger) bis zum eigentlichen Grundwasser; c) fließende und stehende Gewässer. Die Abwässer müssen aber vorher gereinigt werden. Die dazu dienenden Methoden lassen sich in folgende 3 Gruppen einteilen: in die mechanische Klärung, in die chemisch-mechanische Behandlung und in die biologische Reinigung. Die mechanische Klärung umfaßt als Untergruppen die Absinkanlagen und die Absetzanlagen, die gerade bei den Abwässern des Gärungsgewerbes eine besondere Rolle spielen. Sie sind entweder als Faulkammer- oder als Frischwasser-Kläranlagen ausgebildet. Chemische Fällungs- und Behandlungsverfahren sind für gärungsgewerbliche Abwässer meist zu umständlich und zu kostspielig. Von den biologischen Verfahren verdienen namentlich die natürlichen Verfahren der Verrieselung und Beregnung Beachtung. Heuß (Berlin).

Damm, H., Bakteriologische Vorgänge bei der biologischen Reinigung von Molkereiabwasser. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 806.)

Außer mit Hilfe des zusätzlich belüfteten geschlossenen Tropfkörpers kann die biologische Reinigung des Molkereiabwassers auf aerobem Wege ohne Geruchs- und Fliegenbelästigung mit Hilfe des Belebtschlammverfahrens durchgeführt werden. Es gelang die Züchtung eines Schlammes, der außergewöhnlich wenig Protozoen und Fadenbakterien enthielt und doch eine gute Reinigungswirkung hatte. Heuß (Berlin).

Mikrobiologie von Holz usw.

Campbell, W. G, Durch holzzerstörende Pilze hervorgerufene chemische Reaktionen. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 806.)

Pilze der braunen Fäulnis greifen hauptsächlich Kohlehydrate an, während die Zersetzung des Lignins verhältnismäßig unbedeutend ist. Die enzymatische Hauptreaktion ist in diesem Fall eine Hydrolyse. Bei der weißen Fäulnis des Holzes ist der Vorgang verwickelter, neben den Kohlehydraten wird auch das Lignin angegriffen. Die maßgebenden enzymatischen Vorgänge bei der weißen Fäulnis sind Oxydation und Hydrolyse. Es finden statt: 1. Reaktionen, bei denen anfänglich Lignin und Hemizellulosen angegriffen werden, der Angriff auf die Zellulose verzögert wird; 2. Reaktionen, bei welchen anfänglich Zellulose und verwandte Hemizellulosen angegriffen werden und bei denen der Angriff auf das Lignin und die verbleibende Zellulose verzögert ist und 3. Reaktionen, bei welchen anfänglich Kohlehydrate und Lignin gleichzeitig, aber in wechselnden Verhältnissen, angegriffen werden. Heuß (Berlin).

Weidner, H., Wie kann man Hausbockbefall und von anderen Holzinsekten herrührende Beschädigungen des Bauholzes unterscheiden? (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 16. 1936. S. 48—50.)

Außer dem Hausbock gibt es noch andere holzzerstörende Insekten, wie Holzwespen, Pochkäfer und andere Bockkäfer, die nächsten Verwandten

des Hausbocks. Ihre Formenunterschiede, die Beschaffenheit der Oberfläche des befallenen Holzes, der Verlauf der Fraßgänge, ihr Querschnitt und die Art des Bohrmehls werden besprochen und teils bildlich, teils tabellarisch dargestellt. Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz im allgemeinen.

Barrus, M. F., and Crosby, C. R., Control of diseases and insect pests of potatoes in Up-State New York. (Corn. Univ. Extension. Bull. 238. Ausgabe 1935. 27 p.; 6 figs.)

Verff. besprechen die wichtigsten Maßnahmen, die zur Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen der Kartoffel erforderlich sind. Zunächst wird die Beizung behandelt. Neben Sublimat, das kalt und heiß zur Anwendung kommt, wird in steigendem Maße gelbes Quecksilberoxyd angewendet. Dort, wo der Schorferreger abgetötet werden soll, nimmt man Formaldehyd. Bei der Behandlung des Bodens ist es wichtig, daß dieser die richtige Azidität hat. Am günstigsten ist p_H 4,8—5,4. Schwefel ist mit Vorsicht zu verwenden, und zwar nur dort in Mengen von 90—270 kg auf etwa 40 a (1 Acre), wo der Schorf sehr stark auftritt. In manchen Gegenden gibt man zur Bekämpfung des Schorfes 2,7—4,5 kg Kalomel oder gelbes Quecksilberoxyd auf 40 a (1 Acre). Spritzungen oder Bestäubungen sind erforderlich zur Bekämpfung von Phytophthora, des Kartoffelkäfers, von Epitrix cucumeris, Empoasca fabae und Macrosiphum solanifolii. In der Spritzanweisung, die die Bekämpfung aller genannten Krankheiten und Schädlinge vorsieht, sind 8 Spritzungen angegeben. Ausführlich wird die Herstellung der Kupferkalkbrühe besprochen. Wesentlich ist bei der Bekämpfung die Auswahl der geeigneten Spritze. Auf die zu beachtenden Gesichtspunkte wird besonders hingewiesen. Zum Schluß werden Anweisungen für die Bekämpfung von Drahtwürmern, Tausendfüßlern und der Larven von Sciara coprophila und Pnyxia scabei gegeben.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Dills, L. E., and Menusan, H., A study of some fatty acids and their soaps as contact insecticides. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. 1935. p. 63—82.)

Die bisherigen Untersuchungen über die Verwendung von Fettsäuren und ihren Salzen als Schädlingsbekämpfungsmittel weisen drei Nachteile auf: 1. fehlt eine genaue Wasserbestimmung der gebrauchten Lösungen, was für einen wirtschaftlich rechnenden Entomologen von Bedeutung ist; 2. ist das Verhältnis der fettsauren Salze zueinander bei Ermittlung der Wirksamkeit des Präparates nicht bestimmt worden; 3. sind bei derartigen Untersuchungen in erster Linie ackerbauliche Probleme in den Vordergrund gestellt worden, es ist immer auf die stetig wechselnde Handelsware bei Berechnungen Bezug genommen. Daher kommen auch die wechselvollen Berichte verschiedener Autoren. Bei manchen Produkten schwankt der Wassergehalt zwischen 30 und 70%. — Als Testinsekt haben Verff. Aphis rumicis L. und Macrosiphum rosae gezüchtet. Jugendliche Tiere sind weniger widerstandsfähig als alte. Die Verwendung reiner Fettsäuren ergab, daß die insektizide Wirkung eine Funktion der Zahl der C-Atome im Molekül ist. Das Maximum liegt bei etwa 10—12 C-Atomen, demgemäß sind Caprin- und Laurinsäure am stärksten giftig, die Kurve fällt dann auf der Seite der Verbindungen mit abnehmendem C-Gehalt über Capryl- und Capronsäure ab, auf der Seite mit zunehmender C-Zahl über Olein-, Myristin-, Palmitin-,

Stearinsäure. Die Inanspruchnahme der fettsauren K-, Na-Salze ergab eine andere Reihe: Oleate wirkten am heftigsten, es folgen nach Laurate, Caprate, Caprylate, Myristate, Palmitate, Stearate und Caproate. Zugabe von Nikotin als Sulfat veränderte die Reihenfolge der Giftigkeit nicht, der Endeffekt ist keine Summation beider Stoffe. Es wurden auch pflanzliche und tierische Öle in Form ihrer K-Seifen untersucht: Olive, Kokosnuß, Mais, Palme, Baumwollsaat, Maifisch, die die gleiche Gesetzmäßigkeit aufwiesen. Die Seife des Olivenöls führt das meiste Oleat, sie ist auch am wirksamsten. Schließlich gilt dasselbe auch für die Versuchspflanzen (in erster Linie Nutzpflanzen): die stärksten insektiziden Fettsäuren sind auch am meisten für die Versuchspflanzen schädlich gewesen, Laurin- und Caprinsäure wirken auf die Pflanzen zeitlich sogar eher als auf die Insekten und sind schädlicher als eine äquivalente Menge Schwefelsäure. Die fettsauren K-Salze dagegen nehmen mit steigendem Molekulargewicht in ihrer Wirkung ab. Skallau (Berlin).

Wilcoxon, Fr., and Hartzell, A., Further experiments on organic thiocyanates as insecticides. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. 1935. p. 29—36.)

Diese Arbeit stellt die Fortsetzung früherer Studien über die Giftigkeit verschiedener organischer Thiozyanate für Pflanzen sowohl als für ihre tierischen Schädlinge dar. Trimethylendithiozyanat ($CH_2SCN — CH_2 — CH_2SCN$) ist für Aphis rumicis am giftigsten, sein Isomeres ($CH_3 — CHSCN — CH_2SCN$) bedeutend weniger, seine Wirksamkeit sinkt auf etwa 80%. Es folgen Äthylendithiozyanat ($(CH_2SCN)_2$ mit 48—65%, Chlorderivate wie $CH_2Cl — CH_2SCN$ mit 58—78%, $CH_2Cl — CH_2 — CH_2SCN$ mit 55% Tötungskraft. Durch die Einführung eines Ringes wird die insektizide Wirkung wieder stark erhöht: $CH_2SCN — (CH_2)_2 — OC_6H_5$ mit 94—98%. Trimethylendithiozyanat und γ-Thiozyanopropylphenyläther sind für 11 verschiedene Insekten- und 1 Milbenart spezifisch, hierher gehören u. a. Pseudococcus citri Risso, Tetranychus telarius. Von den 75 angewandten Pflanzenarten aus den verschiedensten Gruppen vertrugen 11 Arten das erstgenannte Gift nicht, gegen den Äther waren 16 sehr empfindlich. Weitere Einzelheiten im Original. Skallau (Berlin).

Schädigungen der Pflanzen durch physikalische, chemische und physiologische Einflüsse.

Neuweiler, E., Die Bekämpfung der Herzkrankheit der Runkelrüben. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. Jahrg. 50. 1936. Heft 3. S. 273—291.)

Nach kurzer Literaturübersicht über Ursache und Bekämpfung der Herz- und Trockenfäule bei Runkelrüben werden die Versuche mit Bor geschildert, wie sie von der Eidgenössischen Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon als Gefäß- und Feldversuch durchgeführt wurden. Bei beiden Versuchsreihen gelang es mit Ausnahme eines Feldversuches, durch genügend hohe Bor- und Boraxgaben die Krankheit zu hemmen oder völlig zu beseitigen. Mit steigenden Borsäuregaben nahm der Befall entsprechend ab. Mischungen von Borax und Kupfervitriol ließen z. T. ebenfalls gute Ergebnisse erkennen. Wenn auch der Zeitpunkt der Behandlung von geringer Bedeutung ist, so hängt die Wirkung des Bors weitgehend von der Bodenart ab. Für die Praxis werden zur Bekämpfung der Herz- und Trockenfäule bei Rüben 12 kg Borsäure oder 20 kg Borax je Hektar empfohlen.

Bärner (Berlin-Dahlem).

Hanley, F., and Mann, J. C., The control of heart rot in sugar beet. (Journ. of the Ministry of Agric. Vol. 43. 1936. p. 15—23, 2 Taf.)

Bei Versuchen zur Bekämpfung der Herz- und Trockenfäule zeigte sich, daß mit Mengen unter 14 lb (6,34 kg) Borax auf 1 acre (40,46 a) ein befriedigender Erfolg nicht zu erzielen ist. Nach Ansicht der Verff. liegt die günstigste Menge zwischen 14 und 28 lb. Das Ausstreuen erfolgte mit trockner Erde gemischt etwa 3 Wochen vor der Aussaat. Eine Anwendung von Borax etwa Mitte August, 14 Tage nachdem die ersten Symptome der Krankheit beobachtet wurden, ergab keine nennenswerte Schädigung der Blätter. Andererseits entwickelte sich auf den behandelten Flächen die Krankheit nicht weiter. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Rademacher, B., Die Heidemoorkrankheit (Urbarmachungskrankheit) unter besonderer Berücksichtigung der Kupferfrage. (Arb. d. Biol. Reichsanst. Bd. 21. 1936. S. 531—603, 11 Abb.

Verf. fuhrt zunachst einiges uber die Geschichte und den Namen der Krankheit aus. Er tritt für die Bezeichnung „Heidemoorkrankheit" ein, weil die Krankheit auf Heideboden die weiteste Verbreitung hat und auch auf Boden vorkommt, die länger in Kultur sind, so daß die ursprüngliche Bezeichnung „Urbarmachungskrankheit" mißverständlich ist. Des weiteren wird die Verbreitung der Krankheit besprochen. Im Gebiete ihres geschlossenen Auftretens zeigt sich die Krankheit fast immun auf Böden, die stark podsoliert sind und vor der Kultivierung Heide getragen haben. Die Streuvorkommen der Krankheit liegen vor allem auf Niederungsmooren im Gebiete der Urstromtäler. In 2 Karten wird die Verbreitung der Krankheit in Norddeutschland und im nördlichen Mitteleuropa dargestellt.

Nachdem die verschiedenen Theorien für das Auftreten der Krankheit erörtert sind, wendet sich Verf. eigenen Versuchen zu, die wieder bestätigen, daß die Ursache mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Mangel an pflanzenverfügbarem Kupfer zurückzuführen ist. Auf gleichen Böden, auf denen die Heidemoorkrankheit auftritt, erkrankt das Vieh an Lecksuchterscheinungen, die ebenfalls auf Kupfermangel beruhen und durch Kupferzufütterung geheilt werden können. Untersuchungen der Horizonte an 4 Heideböden ergaben, daß die Kupfermangelerscheinungen am heftigsten in den beiden humusreichen Schichten, der Krume und dem Ortstein zutage traten, während sie im Bleichsand gering waren, und im mineralischen Sand des Untergrundes ganz ausblieben. Bei der Prüfung der Frage, welche Bestandteile des Humus die Festlegung des Kupfers bewirkten, wurde durch Zusatz von Tannin die Wirkung der Kupferung herabgesetzt. Verf. schließt daraus, daß auch physikochemisch gleichartige Stoffe wie Lignin und Huminsäure sich ähnlich auswirken. Das Auftreten der Kupfermangelerscheinungen ist weitgehend von der Wasserversorgung der Pflanzen abhängig. Die Reaktion des Bodens ist ohne Einfluß. Die intensivere Düngeranwendung in den letzten Jahrzehnten hat zu einer rascheren Ausraubung der Mangelböden an Kupfer geführt und daher die Krankheitserscheinungen verschärft. Der mit der Heidemoorkrankheit vielfach verwechselte Frostschaden des Getreides wird vergleichend besprochen. Die Kulturpflanzen erkranken verschieden stark. Sehr stark: Weiß- und Gelbhafer, Sommer- und Wintergerste, Weizen; verschieden stark z. T. gering: Schwarzer Moorhafer, vierzeilige Sommergerste, Runkelrüben, Kohlrüben, Kuhkohl, Wasserrüben, Möhren, Peluschken, Saaterbsen, Pferdebohnen, gelbe Lupinen, Rotklee; wenig oder gar nicht: Rauhhafer, Roggen, Kartoffeln, Zottelwicken, Seradella, Weißklee, Horn-

schotenklee, Spargel, Buchweizen. Zur Verhütung und Bekämpfung der Heidemoorkrankheit muß entweder durch Anbau der entsprechenden Pflanzen das bodeneigene Kupfer verfügbar gemacht werden oder das fehlende Kupfer muß künstlich zugeführt werden. Gewöhnlich genügt die Zufuhr von 50—100 kg Kupfersulfat je ha. Manche Böden verlangen allerdings 200 kg. Eine einmalige Zufuhr reicht für mehrere Jahre aus. Bereits erkrankte Bestände können durch Bespritzung mit 3 proz. Kupfersulfatlösung gerettet werden. Verf. konnte nachweisen, daß das Kupfer durch die Blätter aufgenommen wird. An Stelle der Kupfersulfate können auch kupferhaltige Hederichbekämpfungsmittel angewendet werden. Da zur Gesundung der Pflanze schon kleinste Mengen Kupfer genügen, wurde versucht, durch Beizung des Korns der Pflanze diese Menge zuzuführen. Das Ergebnis war aber nicht befriedigend. Das Auftreten der Krankheit wurde lediglich hinausgeschoben. Der Ansicht des Verf.s, daß durch Verwendung von Kupferkarbonat als Trockenbeizmittel dem Boden größere Mengen Kupfer zugeführt würden, ist entgegenzuhalten, daß eine solche Beizung nur bei Weizen in bezug auf das Auftreten von Krankheiten, die durch Beizung bekämpft werden können, einigermaßen Erfolg haben würde, daß aber bei der Bekämpfung von solchen Krankheiten an Hafer, Gerste und Roggen eine Beizung mit Kupferkarbonat zwecklos sein würde.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Pethybridge, G. H., Marsh spot in pea seeds: Is it a deficiency disease? (Journ. of the Min. Agr. Vol. 43. 1936. p. 55—58.)

Verf. beobachtete die Marschkrankheit auch auf Boden, den man nicht als Marschboden ansprechen konnte. Auffallend war, daß in der Nähe von Erbsenfeldern, die die Krankheit zeigten, an Hafer eine Erscheinung festzustellen war, die der Dörrfleckenkrankheit glich. Verf. stellte deshalb Versuche bei Erbsen mit Mangansulfat an. Verwendet wurde 2 mal eine Lösung von 1½ ounces (42,42 g) auf 20 Gallonen (90,87 l) auf eine Reihe von 20 Yards (182,8 m). Bei allen behandelten Reihen wurde die Zahl der kranken Erbsen herabgesetzt. Da nur das Ergebnis eines Jahres vorliegt und sich auch erhebliche Schwankungen zeigten, hält Verf. weitere Versuche für erforderlich.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Dunlap, A. A., Seedling culture in sand to prevent damping-off. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 278—284, 1 fig.)

Verf. stellte bei seinen Versuchen fest, daß Sämlinge von einer Zahl von Pflanzen in reinem Sand gezogen werden können, dem Nährlösungen zugesetzt werden. Die so gezogenen Sämlinge entwickelten sich ebensogut wie die in behandelten Böden. Auch die Umfallkrankheit trat kaum auf.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Kusano, S., On the parasitism of Olpidium. (Jap. J. Bot. Vol. 8. 1936. p. 155—187.)

Verf. hatte 1932 beim Studium des Parasitismus von Olpidium viciae Kus. Chemotaxis der Gameten und Planozygoten für Kalium gefunden, die den ersten Schritt der Infektion darstellen soll. Im weiteren Verlauf der begonnenen Arbeit waren zwei Probleme für ihn von Bedeutung: 1. die quantitativen Beziehungen zwischen K-Gehalt und Grad der Infektion, 2. die Reaktion der Zellwand auf das Eindringen des Parasiten. Zu 1: Zellsaft von Vicia Faba und Vicia unijuga besitzt K in etwa $^1/_{10}$ mol.

Konzentration. Die chemotaktische Reizbarkeit der Schwärmsporen durch Zellsaft aus den jungen Teilen des Wirtes und durch $^1/_{10}$ mol. KCl ist die gleiche. Sind Zellsaft und parenchymatisches Gewebe arm an K, so ist ihre chemotaktische Anziehungskraft entsprechend geringer wie z. B. bei Lycopersicum esculentum, Calystegia japonica, Rubus trifidus, Caesalpinia japonica u. a. Solanum tuberosum und Dahlia var. locken zwar stark an, töten aber die Sporen. Auch bei Eindringen in Physalis Alkekengi, Taraxacum platycarpum, Oenothera biennis gehen die Schwärmer zugrunde. Enthalten die Epidermiszellen wenig K, so ist die Infektion bedeutend schwieriger. Pflanzen, die keine Wirte für den Schadpilz sind, führen offenbar Giftstoffe oder zumindest hemmende Substanzen, die die K-Wirkung der eigenen Zelle aufheben. Auf Grund seiner Versuche behauptet Verf., daß das K allein die Chemotaxis veranlaßt, nicht noch irgendwelche anderen Verbindungen. Im Zusammenhang hiermit spielt auch die Exkretion des K durch das Laubblatt eine Rolle, die Blätter, die stark K exosmieren, also jugendliche, werden auch am ehesten vom Pilz befallen. Zu 2: Befallene Zellen reagieren durch „Kallusbildung", eine Erscheinung, die schon durch Young und Stevens beobachtet wurde. An der Eingangsstelle werden vom Protoplasten kleine Scheiben abgesondert, die zu geschwulstartigen Anhängen weiterwachsen. Neben den eigentlichen Wirten wurden auch andere Pflanzen infiziert, die sich alle verschieden verhielten, so daß Verf. eine Einteilung in 5 Gruppen vornahm, je nach der Reizwirkung von Zellsaft und Gewebe. Bezüglich der Anlockbarkeit durch K und der Kallusbildung besteht zwischen Wirten und Nichtwirten kein Unterschied. Diese letzten scheiden jedoch Abwehrstoffe aus, die verschieden wirken. Die Kallusbildung verhindert manchmal ebenfalls das Eindringen des Parasiten.

Skallau (Berlin).

Bockmann, H., Untersuchungen über die Schadwirkung von Cercosporella herpotrichoides Fron an Getreide. (Arb. d. Biol. Reichsanst. Vol. 21. 1936. S. 625—634, 5 Abb.)

Durch Infektionsversuche im Vegetationshaus konnte nachgewiesen werden, daß Cercosporella herpotrichoides die Halmbruchkrankheit hervorrufen kann. Während in einigen Fällen eine Ertragsminderung bis zu 50% eintrat, war sie in anderen nur gering. In der Praxis wurden Verluste durch die Halmbruchkrankheit bis zu 75% beobachtet. Es kamen aber Fälle vor, in denen trotz ausgeprägten Befalls keine fühlbaren Schäden auftraten. Die Halmbruchkrankheit tritt in erster Linie an Wintergetreide, besonders an Weizen, aber auch an Gerste und Roggen auf.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Findlay, D, H., and Sykes, E. T., Destruction of potato haulm to prevent blight infection of the tubers. (Journ. of the Ministry Agric. Vol. 43. 1936. p. 457—459.)

Verff. führten vergleichende Versuche mit 12½% Schwefelsäure und 5% Kupfersulfatlösung zur Vernichtung der Kartoffelstrünke kurz vor der Ernte durch. Mit dieser Maßnahme soll verhindert werden, daß Phytophthora von der Pflanze in den Boden und damit an die Knolle gelangt. Kupfersulfat erwies sich ebenso wirksam wie Schwefelsäure, und war auch billiger. Außerdem hat es den Vorteil, daß es in der Anwendung angenehmer ist und daß man keine Spezialspritzen gebraucht.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Perleberger, J., Phytophthora stem and tip blight of citrus seedlings. (Agric. Res. Stat. Rehovoth Bull. 20. 1936. 23 p.; 9 figs.)

1932 trat in Palästina eine bis dahin nicht beobachtete Erkrankung von Zitrussämlingen auf. Die Krankheitssymptome werden eingehend beschrieben. Als Erreger wurden Phytophthora parasitica und P. citrophthora festgestellt. Zur Bekämpfung der Krankheit ist es unbedingt erforderlich, daß die Samen aus Früchten genommen werden, die vom Baum gepflückt wurden. Die Saatbeete müssen vor der Aussaat mit Formaldehyd 1 : 100 desinfiziert werden. Die Samen sind mit Uspulun oder Ceresan im Tauchverfahren zu beizen. Die Erwärmung der Saatbeete durch Verwendung von organischem Dünger ist nicht angebracht. Die Boden- und Luftfeuchtigkeit darf in den Saatbeeten nicht zu hoch sein. Täglich muß gelüftet werden. 1 Woche nach dem Auflauf werden die Sämlinge mit 0,5proz. Kupferkalkbrühe gespritzt. 10 Tage später ein zweites Mal mit 1proz. Brühe. Die erkrankten Sämlinge müssen sofort entfernt werden.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Quick, C. R., Chemical control of harmful fungi during stratification and germination of seeds of Ribes roezli. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 694—697.)

Bei der Anzucht von Sämlingen von Ribes roezli wurden diese vielfach durch Umfallen vernichtet. Verf. versuchte durch Anwendung von einer großen Anzahl von Mitteln die Krankheit zu bekämpfen. Am besten bewährte sich Kupferoxalat 6—10 g auf 929 qcm. Etwas geringer in der Wirkung war Kupferkarbonat 4—8 g auf 929 qcm. Die Pulver werden am besten ausgestreut und der Boden dann angefeuchtet. Man kann die Pulver auch in Wasser aufschwemmen und dann über die Kultur verteilen. Verdünnte Salpetersäure 1 : 70 und Formaldehyd 1 : 750 schützten den im Boden liegenden Samen recht gut.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Dixon, L. F., Mc Lean, R. A., and Wolf, F. A., Relationship of climatological conditions to the tobacco downy mildew. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 735—759, 5 figs.)

Der erste Ausbruch des Mehltaus an Tabak tritt nicht in jedem Jahre zur gleichen Zeit auf. Er erfolgt während oder nach einer Warmwetterperiode, wenn das Temperaturminimum am Boden mehrere Tage mehr als 50° F (10° C) beträgt und wenn die Sämlinge so groß sind, daß die unteren Blätter den Boden berühren. Der 2. Ausbruch zeigt sich etwa 14 Tage nach dem ersten. Die Sporenbildung wird durch hohe Luftfeuchtigkeit bei bedecktem Himmel begünstigt. Reichliche Sporenbildung erfolgt bei 5,6—17° C. Einzelne Sporangien werden noch bei Temperaturen über 20° C und unter 2° C gebildet. Die Verbreitung der Sporen erfolgt durch den Wind.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Yarwood, C. E., The tolerance of Erysiphe polygoni and certain other powdery mildews to low humidity. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 845—859.)

Bei günstigen Temperaturen keimten die Konidien von Rotklee und von der Bohne gut bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 0—100%. Konidien an den Konidienträgern auf befallenen Blättern an der Pflanze oder abgetrennte Konidien auf der Oberfläche von gesunden Blättern wurden durch niedrige relative Luftfeuchtigkeit weniger geschädigt als Konidien

auf abgetrennten Blättern oder auf Glasplatten. Das Myzel vom Mehltau an Klee wuchs bei niedrigen Temperaturen ebenfalls bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 1—100%. Infektionen an Klee, Bohne, Kohl, Gerste, Warzenmelone (Kantaloupe), Delphinium und Senf gingen bei niedriger relativer Luftfeuchtigkeit an. Die Konidienträger bei Bohnen- und Senfmehltau wurden durch starken Regen zerstört. Mehltau an Erbsen oder Bohnen wurde durch Bespritzen mit Wasser geschädigt oder vernichtet.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Fluiter, H. J. de, Corticium Gardeniae Zimm. op koffie. [Corticium Gardeniae auf Kaffee.] (Meded. v. h. Besoekisch Proefstation, April-Heft, 1936 in: Archief v. d. koffiecultuur in Ned. Indië. S. 14—21, 7 Abb.)

Da dieser Pilz nur von Gardenia florida bekannt war, haben wir es hier mit einer neuen Kaffeekrankheit zu tun. Anfangs wurde derselbe für Corticium Koleroga v. Höhn. gehalten, nachdem aber vom Verf. die Fruchtkörper mit den Basidiosporen gefunden wurden, konnte der Pilz mit C. Gardeniae identifiziert werden. Die Krankheit kommt nur in höher gelegenen Pflanzungen vor. Der Pilz bildet 1—2 mm breite silberweiße Fäden auf den Stämmen und an den Unterseiten der Zweige und Blattstiele, worin nach einiger Zeit typische „Knoten" auftreten. In diesem Stadium dringt das Myzel noch nicht in das Blatt ein. Dies findet vielmehr erst statt, nachdem die flachen Sklerotien entstanden sind. Die Blätter werden schwarz und sterben ab. Beim Abfallen werden sie jedoch von den weißen Myzelfäden aufgefangen, bleiben hängen und ergeben so das typische Krankheitsbild. Die Bekämpfung geschieht durch Verbrennung der befallenen Zweige und Blätter, durch Sprühen mit Bordeauxbrühe und schließlich durch teilweises Abschneiden der Blätter der jungen Pflänzchen.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Gregor, M. J. F., A disease of Bracken and other ferns caused by Corticium anceps (Bres. ed Syd.) Gregor. (Phytopath. Ztschr. Vol. 8. 1935. p. 401—419.)

Seit mehreren Jahren wird das Auftreten von Pteridium aquilinum in manchen Teilen von Großbritannien, besonders in den Gebirgsregionen von Schottland zu einer ernsten Plage. Das Auftreten von Krankheiten unter den Farnen legte den Gedanken einer biologischen Bekämpfung nahe. Verf. konnte als Erreger einer dieser Krankheitsformen Corticium anceps feststellen. Nach Beschreibung der Krankheitssymptome wird das Eindringen des Parasiten näher beschrieben. Basidienbildung erfolgt auf der Unterseite der Wedel in weißen filzigen Überzügen. In Vitro wurden keine Basidien gebildet. Die Basidiosporen können schon im Hymenium auskeimen und zwar entweder durch Bildung von Sekundärsporen auf kurzen Promyzelien, häufiger aber durch direktes Auswachsen zu einem Keimschlauch. Sklerotienbildung tritt reichlich auf. Künstliche Infektionen gelangen an A. spinolosum, A. aculeatum var. lobatum, Asplenium Trichomanes, Polypodium vulgare, Blechnum spicant, Cystopteris fragilis, Scolopendrium vulgare. Hohe Luftfeuchtigkeit begünstigt die Krankheit, die aber keine Gefährdung der Adlerfarnbestände bedeutet.

Braun (Berlin-Dahlem).

Allington, W. B, Sclerotial formation in Rhizoctonia solani as affected by nutritional and other factors. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 831—844, 1 fig.)

Auf Agar bildet Rhizoctonia solani erst dann Sklerotien, wenn der ganze Nährboden von dem Pilz bedeckt ist. Die meisten Sklerotien zeigen sich bei niedrigem Gehalt an Kohlehydrat und hohem Stickstoffgehalt des Nährbodens. Die verschieden starke Bildung von Sklerotien kann durch die Verschiedenheit der Stickstoffquelle bedingt sein. Kalziumnitrat, Asparagin, Ammoniumnitrat, Harnstoff und Natriumnitrat beeinträchtigen die Sklerotienbildung. Unterschiede in der Sklerotienentwicklung auf Nährboden mit Traubenzucker, Rohrzucker oder Kartoffelstärke wurden nicht beobachtet. Glyzerin und Milchsäure wurden nicht richtig ausgenutzt. Bei einer geringen Herabsetzung der Nährstoffe wurde die Bildung der Sklerotien beschleunigt, stärkere Herabsetzung verminderte sie. Rhizoctonia solani kann die Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens verändern. Die Richtung und der Grad der Veränderung ist durch die Stickstoffquelle bedingt. Bei p_H 7 wird das Wachstum und die Sklerotienbildung begünstigt. Der Pilz ist gegen Säure nicht sehr empfindlich, wohl aber gegen Alkali.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Costa, A. S. und Krug, H. P., Eine durch Ceratostomella hervorgerufene Welkekrankheit der Crotalaria juncea in Brasilien. (Phytopath. Ztschr. Bd. 8. 1935. S. 507—513.)

Verff. berichten über eine Welkekrankheit von Crotalaria juncea, als deren Erreger sie eine Ceratostomellaart, vermutlich C. fimbriata (E. u. H.) Elliot oder eine andere nahestehende Art feststellen konnten, während bisher als Erreger von solchen Krankheiten an Crotalaria nur Fusarien oder Rhizoctonia solani angegeben worden sind. Die Symptome der Krankheit werden beschrieben. Die genauen Maße für Perithezien, Asci, Ascusporen und Konidien werden mitgeteilt. Infektionsversuche fielen positiv aus. Die Inkubationszeit wird mit 4—20 Tagen angegeben. Der Pilz lebt vermutlich saprophytisch im Boden. Versuche, ob die Krankheit durch Samen übertragen werden kann und wie sie zu bekämpfen ist, sind eingeleitet.

Braun (Berlin-Dahlem).

Hahn, G. G., Immunity of Viking red currant from white pine blister rust under field conditions. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 860—875, 2 figs.)

Die Ribes-Sorte Viking currant erwies sich auch in Amerika als resistent gegen Cronartium ribicola. Die Sorte wuchs gut auf geeigneten Böden im Norden von Neu-England. Auch Trockenheit überstand sie gut.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Kirby, R. S., Diseases of small grains. (N. Y. State College of Agric. Corn. Un. Ext. Bull. 157. Ausgabe 1935. 71 p., 31 figs.)

Verf. bringt eine Zusammenstellung der wichtigsten Krankheiten von Weizen, Hafer, Gerste und Roggen. Bei den einzelnen Krankheiten wird zuerst das Krankheitsbild, dann der Erreger und schließlich die Maßnahmen zur Bekämpfung beschrieben. Teilweise werden die Bekämpfungsverfahren eingehender behandelt. Wenn auch in Einzelheiten nicht der neueste Stand der Forschungen wiedergegeben wird, so bietet die Schrift doch besonders wegen der guten Abbildungen für den, der sich über die Krankheiten des Getreides unterrichten will, ein brauchbares Hilfsmittel. Beim Flugbrand

der Gerste wird z. B. nicht darauf hingewiesen, daß nach den Feststellungen von Tapke als Erreger 2 verschiedene Pilze in Frage kommen: Ustilago nuda und U. nigra, von denen der erstere nur mit Heißwasser, der zweite jedoch auch mit chemischen Mitteln bekämpft werden kann. Nach der Darstellung des Verf.s wird der Eindruck erweckt, als ob der angegebene Erreger U. nuda bis zu einem gewissen Grade durch chemische Mittel bekämpft werden kann. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Buchheim, A., Einfluß von Brandbefall auf Wachstum und Habitusbild der Wirtspflanze. (Phytopath. Ztschr. Bd. 8. 1935. S. 615—621.)

Um die Frage zu klären, ob Brandbefall das Wachstum der Pflanze fördert oder hemmt, was bekanntlich beides behauptet wird, hat Verf. gesunde und mit einer reinen Linie infizierte Hirsepflanzen untersucht. Zunächst konnte festgestellt werden, daß die mittlere Länge von beblätterten Stengeln brandiger Pflanzen erheblich größer war als diejenige von beblätterten Stengeln gesunder Pflanzen. Ebenso war die Blattzahl im ersten Fall größer. Dagegen bleibt die Blütenrispe brandiger Pflanzen in ihrem Wachstum stark zurück. Verf. führt diesen Unterschied auf die verschiedene Intensität der Myzel- und Sporenentwicklung des Pilzes zurück. Er weist schließlich auf die Ähnlichkeit im Habitus von brandbefallenem Mais, Hirse und Sorghum hin und meint, daß unter dem Einfluß von parasitischen Pilzen die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Vertretern einer Familie deutlicher hervortreten. Braun (Berlin-Dahlem).

Fischer, G. W., The susceptibility of certain wild grasses to Tilletia tritici and Tilletia levis. (Phytopathology. Vol. 26. 1936. p. 876—886, 3 figs.)

An Agropyron cristatum wurden gelegentlich Brandbutten gefunden, die darin enthaltenen Sporen glichen morphologisch denen von Tilletia tritici. Bei Infektionen zeigten die Weizensorten Hybrid 128 63,1 und Hard Federation 65 % Befall. A. cristatum, A. subsecundum und A. pauciflorum wurden durch bestimmte physiologische Formen von F. tritici und T. levis befallen. Hordeum nodosum war nur für T. tritici anfällig. H. jubatum und H. murinum wiesen überhaupt keine Infektionen auf.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Popowa, T., Leinrostbekämpfung. (Lein u. Hanf. Bd. 5. 1935. S. 14—17.) [Russisch.]

Die Verbreitung des Leinrostes (Sommerstadium zur Periode der Leinblüte und Winterstadium bei der Ernte) betrug: auf den ungedüngten Parzellen 0 bzw. 10% (Leinertrag = 100), auf den mit mäßiger NPK-Gabe gedüngten Parzellen 6 bzw. 20% (Leinertrag = 267) und auf den mit doppelter N- und normaler PK-Gabe gedüngten Parzellen 29 bzw. 60% (Leinertrag = 243). Als gutes Bekämpfungsmittel gegen den Leinrost hat sich das Präparat von Dawydow sowie Kalziumzyanamid mit Oleogumbrin erwiesen. M. Gordienko (Berlin).

Verona, O., and Ceccarelli, A., Su di una tracheomicosi dell'amaranto (Amarantus tricolor L.) prodotta da una specie di Fusarium e da Verticillium amaranti

n. sp. e, in genere, sulla biologia di alcuni Verticillium patogeni. (Phytopath. Ztschr. Vol. 8. 1935. p. 373—400.)

Verff. berichten über das Auftreten einer Welkekrankheit an Amaranthus tricolor, bei der sie ein nicht näher bestimmtes Fusarium und eine neue Spezies von Verticillium isoliert haben, der sie den Namen V. amaranti geben und für die sie eine genaue Diagnose anführen. Das Verhalten dieses Pilzes in vitro auf Bohnen-Saccharose-Agar wird beschrieben. Er bildet Konidienträger von 150—180 μ Länge mit meist 2—3 Wirteln, die aus 3—4 Zweigen von 24—32 μ Länge bestehen. Die Konidien haben eine Größe von 4,8—6,4 bzw. 3,0—3,2 μ. Es treten auch Pseudosklerotien auf, die von 9,6 bzw. 6,4 μ großen Chlamydosporen gebildet werden. Infektionsversuche mit beiden Pilzen auf A. tricolor und Sempervivum tectorum fielen positiv aus. Als optimale p_H-Werte wurden gefunden für V. alboatrum 8,5, V. tracheiphilum 5,6, V. amaranti 5,0, V. dahliae 4,9. Das Temperaturoptimum betrug in allen Fällen 24—26° C. Alle 4 Arten assimilierten leicht Pepton und benutzten Glukose als Kohlenstoffquelle. Malachit- und Brillantgrün verhinderten die Entwicklung bereits bei Konzentrationen von 1 : 200 000—1 : 500 000. Bei Kaliumnitrat als N-Quelle wurde Nitrit gebildet. Außerdem trat bei V. amaranti ein wärmebeständiger Stoff auf, der die Keimung von Weizen-, Klee-, Luzerne- und Amaranthus-Samen verhinderte.

Braun (Berlin-Dahlem).

Steven, W. F., Studies on the cultural behaviour and pathogenicity of a strain of Valsa. (Phytopath. Ztschr. Vol. 8. 1935. p. 479—505.)

Verf. hat Untersuchungen über das Verhalten eines von Sorbus chamaemespilus isolierten Stammes von Valsa durchgeführt. Der Einfluß der Temperatur ist einmal an dem Gewicht des in einer bestimmten Zeit gebildeten Myzels in einem flüssigen Nährmedium gemessen, zum anderen an der flächenmäßigen Ausbreitung auf einem festen Nährboden. Das Temperaturoptimum liegt verhältnismäßig hoch, etwa zwischen 27 und 30° C. Eine genaue Übereinstimmung zwischen den beiden Verfahren konnte allerdings nicht erzielt werden. Auch der Einfluß der Temperatur auf die Bildung von Pykniden und Pyknosporen ist geprüft worden. Der optimale p_H-Wert liegt anscheinend zwischen 4,8 und 5,1. Während des Wachstums tritt immer eine Verschiebung nach der sauren Seite ein. Niedrige Luftfeuchtigkeit beschleunigte die Sporenbildung, so lange das Medium feucht genug für eine reichliche Pyknidienbildung blieb; oberhalb 82% Luftfeuchtigkeit wurden keine Sporen mehr gebildet. Infektionsversuche an Sorbus domestica und S. aucuparia mit Valsa nivea von Populus nigra, V. personii von Prunus persica und P. mahaleb, V. cincta von Prunus armeniaca und Valsa von Sorbus chamaemespilus ergaben, daß V. cincta am virulentesten war, sich aber auch nur in bereits geschwächten Pflanzen auszubreiten vermochte. Es wird festgestellt, daß der neu isolierte Stamm deutlich verschieden ist von V. personii und V. nivea.

Braun (Berlin-Dahlem).

Banfield, W. H., Studies in Cellular Pathology. I. Effects of Cane Gall Bacteria upon the Black Raspberry. (Bot. Gaz. Vol. 97. p. 193—239. 1935.)

Diese auf Rubus occidentalis Gallen erzeugenden Bakterien sind von manchen Autoren als Phytomonas tumefaciens (Bact. tum. Smith u. Town) angesehen worden, der die Kronengallbildung veranlaßt. Nach Ansicht des Verf.s handelt es sich aber um zwei verschiedene Organismen. Das infizierende Bakterium wandert zwischen den Zellwänden ein und bildet dort Zooglöen, die die Mittellamellen auflösen. Entfernter liegende Zellen werden zu Teilungen angeregt, es bilden sich Gallen. Die von den Bakterien befallenen Zellen entarten entweder durch Zytolyse oder Autolyse. Um eine sichere Unterscheidung von den ähnlich aussehenden Bestandteilen (Plastiden, Mitochondrien) des Plasmas zu ermöglichen, hat Verf. ein Präparationsverfahren ausgearbeitet, das mit Cr-Os-Säure nach Benda beizt, mit der Erlickischen Flüssigkeit härtet und mit Hämatoxylin färbt. Nur die Bakterien werden bei dieser Behandlung blau.

Skallau (Berlin).

Petre, A. W., Factors influencing the activity of tobacco mosaic virus preparations. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. p. 19—28. 1935.)

Die Methode von Vinson und Petre zur Gewinnung von Virus arbeitet mit Phosphatpuffern und verschiedenen Bleiazetaten bestimmter Konzentration. In Abänderung dieser Methode hat Verf. jetzt die Konzentration des KH_2PO_4-Puffers erhöht (für die erste Fällung), da sich die Zugabe größerer Mengen des sauren Puffers bei stärkerer Pigmentkonzentration als wirkungslos erwies. Eine Vermehrung der Säure des Puffers steigert die Aktivität des Virus, erschwert jedoch die Entfernung des Pigments. Wendet man für die letztgenannte Operation kräftige Konzentrationen von KH_2PO_4 an, so muß der Puffer alkalisch sein, mindestens $p_H = 6{,}5$ haben, damit die Bleiazetatfällung beim Saft von Feldpflanzen vollkommen wirksam ist, der optimale Bereich liegt zwischen $p_H = 7{,}5$ und 8,4. Ein Teil der Versuchspflanzen — Nicotiana tabacum L. — setzte Verf. während des Impfversuches in einen Glaskäfig. Infolgedessen entwickelten diese Pflanzen einen höheren Sukkulenzgrad. Es ergab sich, daß gerade diese Pflanzen bedeutend weniger anfällig gegen das Tabak-Mosaik-Virus waren, die Beziehungen zwischen Resistenz und Sukkulenz bedürfen jedoch noch genauerer Untersuchungen. Dagegen spielt die Wachstumsgröße keine Rolle für den Grad der Empfänglichkeit. Skallau (Berlin).

Youden, W. J., Beale, H. P., and Guthrie, J. D., Relation of virus concentration to the number of lesions produced. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. 1935. p. 37—54.)

Verff. haben die experimentellen Daten von Beale, Caldwell, Chester Holmes, Price, Samuel und Bald aus Arbeiten über verschiedene Virus mathematisch bearbeitet, um die Ergebnisse auf eine einheitliche Formel zu bringen. Die Genannten haben Zählungen von Läsionen des Tabak-Mosaik-, Cucumber-Mosaik-, Aucuba-Mosaik-Virus und der Ring-Fleckenkrankheit bei Nicotiana glutinosa, Phaseolus vulgaris, Vigna sinensis durchgeführt. Als Verdünnungslösungen wurden Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Ringerlösung, $^1/_{10}$ mol. K_2HPO_4 gebraucht. Trotz der Verschiedenheit des Materials und der angewandten Methodik konnten Verff. das Verdünnungsgesetz auf diese Formel bringen:

$$y = N\left(1 - e^{-ax}\right)$$

Hierin bedeuten: y die Zahl der Läsionen, x die Viruskonzentration, N und a sind Versuchskonstanten, die bestimmt werden müssen, N ist das Maximum der überhaupt möglichen Läsionen — vielleicht die Größe der Blattfläche, die überhaupt infiziert werden kann —, a ist, rein theoretisch gesprochen, die Durchschnittszahl der infizieren-

den Organismen pro empfängnisfähige Fläche. Die früheren Unstimmigkeiten liegen einmal in der Anwendung verschiedener Bezugssysteme begründet, dann aber auch darin, daß die Zahl der Läsionen als zweite Variable neben der Verdünnung angesetzt wurde. Nicht die Zahl der tatsachlich beobachteten Läsionen, sondern diejenige der nicht erscheinenden folgt einem einfachen Exponentialgesetz. Die Konstanten werden aus Verdünnungsreihen berechnet. Unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse konnten Verff. z. B. herleiten, daß normales Serum die Große N verkleinert, Antiserum dagegen beide Werte (N und a) verringert. Skallau (Berlin).

Tierische Schädlinge.

Hartzell, A., and Youden, W. J., Efficiency of banding for the control of cankerworms. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 7. 1935. p. 365—377.)

Ulmus americana, Acer rubrum, Betula lenta und Carya ovata wurden im Oktober mit breiten Asphaltbändern versehen, um festzustellen, ob durch diese Fangmethode einer Verbreitung der Mottenlarven von Alsophila pometaria Harris und Paleacrita vernata Peck Einhalt getan werden kann. Es stellte sich heraus, daß auf diese Weise der Pflanzenschädling nicht vernichtet werden konnte, betrug doch der Unterschied zwischen dem Laub der unbebänderten und bebänderten Bäume gewichtsmäßig kaum 10%. Die Ursache des Mißlingens dieser Fangmethode liegt darin, daß die Larven sich an selbst erzeugten Fäden aufhängen und von hier aus bei starkem Wind auf einen anderen Baum getrieben werden, so daß das Hochkriechen von der Erde aus wegfällt. Skallau (Berlin).

Piljugina, A. O., Chaetocnema breviuscula Fald. und ihre Bekämpfung. (Die soz. Kornwirtschaft. Bd. 4. 1935. S. 102—107.) [Russisch.]

Manche Gebiete mit ausgedehntem Zuckerrübenbau in Rußland werden von Chaetocnema breviuscula Fald. stark befallen. Das nähere Studium dieses Schädlings ergab, daß der Schaden eigentlich nur durch den Käfer verursacht wird, während die Larve sich meist von Seitenwurzeln der Atriplex- und Chenopodium-Arten nährt. Die Verbreitung der Ch. br. Fald. hängt sehr von den Witterungsverhältnissen im Frühling ab, und zwar steigt sie beträchtlich mit der Trockenheit zu dieser Jahreszeit. Als kritische Zeit in der Entwicklung der Zuckerrübe in bezug auf die Gefahr durch Ch. br. Fald. soll das Aufkeimen betrachtet werden, wo der Schädling die ersten Blättchen vernichtet; ein späteres Befallen wirkt mehr auf den Zuckergehalt der Rüben (bedeutende Verminderung). Als ein gutes Bekämpfungsmittel hat sich Bespritzen mit Kalziumarsenat mit Kalk (1 : 5) erwiesen. Außerdem wird frühe Aussaat sehr empfohlen.

M. Gordienko (Berlin).

Tierkrankheiten. Tierparasiten.

Schweizer, G., Bacillus hirudinis, ein spezifischer Symbiont des Blutegels. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 235—240.)

Der Verdauungsschleim von Hirudo medicinalis und H. officinalis enthält massenhaft ein Bakterium, das Verf. für den Oesophagussymbionten des Blutegels hält. Die Kultur gelang, vom Schleim ausgehend, auf Blut, das nach dem Kaltsterilisationsverfahren des Verf.s sterilisiert

war. Das Bakterium hat wetzsteinförmige Gestalt, ist beweglich und bildet Endosporen. Es hat kräftige eiweißbauende und hämolytische bzw. hämoglobinolytische Wirkung und hemmt in bemerkenswertem Umfange das Wachstum sonstiger Mikroorganismen. Das Bakterium erhält den Namen Bacillus hirudinis n. spec. Rippel (Göttingen).

Verschiedenes.

Heicken, K., Die keimtötende Wirkung überhitzten Wasserdampfes. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. I. Orig. Bd. 136. 1936. S. 249—255.)

Das Sporentötungsvermögen des Wasserdampfes sinkt bei Überhitzung um so stärker und rascher, je mehr sich seine Temperatur von der des gesättigten ungespannten Wasserdampfes entfernt, bis bei etwa 135° ein Minimum der Wirkung erreicht wird. Oberhalb dieser Temperatur steigt die keimtötende Kraft des überhitzten Wasserdampfes stark an. Die Ursache der verlängerten Abtötungszeiten dürfte in dem bei Einwirkung überhitzten Wasserdampfes sich rasch vermindernden Feuchtigkeitsgehalt der Sporenzelle zu suchen sein; denn mit steigender Temperatur wird der Dampfdruck des hygroskopisch gebundenen wie auch des unter Umständen vorhandenen Kondenswassers immer größer, ebenso wie das Bestreben des überhitzten Dampfes, Wasser aufzunehmen. Die Sporenzelle wird demnach mit steigenden Temperaturen das durch Kondensation oder hygroskopische Wasseranziehung aufgenommene Wasser mit immer größer werdender Geschwindigkeit verlieren. Das Eiweiß wird durch die Austrocknung schwerer koagulierbar, die Abtötungszeiten werden immer länger, bis schließlich ein Temperaturgebiet erreicht wird, bei dem die Wärme die ausschlaggebende Rolle beim Abtötungsprozeß übernimmt. Oberhalb von 135° wirkt der überhitzte Wasserdampf ähnlich wie trockene Hitze. Nach fast linearem Anstieg der Abtötungskurve von 135° ab tritt bei etwa 150° eine geringe Abflachung ein. Diese ist wohl dadurch bedingt, daß die Zeiten, die zur Erwärmung der Testobjekte erforderlich sind, bei den kurzen Abtötungszeiten von wesentlichem Einfluß sind.

Über die keimtötende Wirkung überhitzten Wasserdampfes bei gleichzeitiger Steigerung des Druckes geben die vorliegenden Versuche keine Auskunft. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Lieske, R., Umsetzung brennbarer Gase durch Bakterien. (Chemiker-Ztg. Bd. 60. 1936. S. 806.)

Brennbare Gase können unter völligem Ausschluß von freiem Sauerstoff durch Bakterien umgesetzt werden. Es gibt Bakterien, die Kohlenoxyd mit Wasserstoff zu Methan und Wasser reduzieren oder Kohlensäure mit Wasser in Kohlensäure und Wasserstoff überführen und das entstandene Gasgemisch weiter in Methan und Wasser umwandeln. Methan könnte also auf biologischem Wege sowohl aus Kohlenoxyd als auch aus Kohlensäure gewonnen werden. Da Leuchtgas Wasserstoff und Kohlenoxyd enthält, könnte man das Kohlenoxyd auf biologischem Weg ohne wesentliche Verminderung der Heizkraft des Gases in Methan umwandeln und dieses so entgiften.

Heuß (Berlin).

Dold, H., Lächele, W. und Du Dscheng Hsing, Über die Eigenschaften, Wirkungsbreite und Wirkungsart der antibakteriellen Hemmungsstoffe (Inhibine) des mensch-

lichen Speichels. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 118. 1936. S. 369—395.)

Die von Dold und Weigmann im Speichel gefundenen, gegen Diphtheriebakterien wirksamen Hemmungsstoffe (Inhibine) erwiesen sich auch wirksam gegenüber Staphylokokken, Streptokokken, Bact. coli, typhi, paratyphi B, pyocyaneum, prodigiosum, Vibrionen, Bac. subtilis, anthracis. Die Inhibine des Speichels sind thermolabil (Vernichtung nach 30 Min. Erhitzung auf 52—54°). Längeres Lagern des Speichels bei Zimmertemperatur (10—15 Tage) hatte ein allmähliches, mehr oder weniger vollständiges Verschwinden der Inhibine zur Folge. Auch gegen Eintrocknung und Belichtung bestand Empfindlichkeit. Die Inhibine erwiesen sich als nicht wasserlöslich, nicht ausfällbar durch Alkohol, Chloroform und Azeton, nicht filtrierbar durch Seitz-Asbest-Filter und nicht diffundierbar. Sie sind nicht komplex gebaut wie bakterizide Antikörper (die durch Hitze beseitigte Hemmungswirkung des Speichels ist nicht durch Zusatz geringer Mengen frischen Speichels wieder herstellbar).

Die im Speichel nachgewiesenen Hemmungsstoffe sind nicht identisch mit den Lysozymen, ihre Wirkung beruht auch nicht etwa auf den im Speichel vorhandenen Salzen oder auf Bakterien-Antagonismus (es bestand keine Beziehung zwischen der Hemmungswirkung des Speichels und dessen Bakteriengehalt). Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Höring, F., Die klinische Bewertung der Stuhlflora-Morphologie. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 15. 1936. S. 697—700.)

Im Stuhlausstrich von Gesunden finden sich bei Anwendung des aeroben Plattenverfahrens (Blutplatte, Gaßner- und Endoplatte) überwiegend Colibakterien, sehr häufig Enterokokken, seltener Staphylokokken; andere Keime, besonders wenn sie in größerer Menge vorhanden, können nicht mehr zur normalen Stuhlflora gerechnet werden. Die beim Gesunden vorkommenden Keime zeigen weder abnorme Wuchsformen noch Hämolyse. Das Zahlenverhältnis von Coli zu den Enterokokken ist von Fall zu Fall verschieden, aber beim gleichen Individuum über lange Zeit konstant, möglicherweise abhängig von der Kost; die saure oder alkalische Reaktion des Stuhles ist offenbar ohne Einfluß auf dieses Verhältnis.

Bei einschneidendem Klima- oder Ernährungswechsel treten vorübergehend, auch ohne subjektive Krankheitserscheinungen, erhebliche Veränderungen der Darmflora auf, die sich jedoch bald wieder ausgleichen.

Bei akuten Krankheiten, insbesondere bei solchen des Darmes, treten in der Regel deutliche Veränderungen auf, die vor allem an der Coliflora (Paracoli) nachweisbar sind.

Bei chronischen Erkrankungen finden sich die verschiedensten Grade und Arten der Veränderung der Stuhlflora. So kommt es bei chronischen Magen- und Darmstörungen häufig zur Entwicklung eines Hämolysierungsvermögens sowohl bei Colibakterien als auch bei den verschiedenen Kokken, nach Darmoperationen tritt häufig Bact. pyocyaneum auf, bei schweren ulcerösen Dickdarmprozessen entsteht eine hochgradige Veränderung mit Beimischung ortsfremder Keime. Klinische Besserung macht sich in einer Besserung der Floraverhältnisse bemerkbar.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Abgeschlossen am 7. Januar 1937.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 95 enthaltenen Arbeiten.

II. Namen- und Sachverzeichnis.

(Stichworte, die auf Originalarbeiten hinweisen, sind durch ein * gekennzeichnet.)

Hofbuchdruckerei Rudolstadt